



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE TOXICIDADE EM EFLUENTE DA FABRICAÇÃO DE RESINAS DE POLIÉSTER

Roberto Augusto Caffaro Filho
Biólogo

Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas, SP, Brasil – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C116a Caffaro Filho, Roberto Augusto
Avaliação e identificação de toxicidade em efluente da fabricação de resinas de poliéster / Roberto Augusto Caffaro Filho. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Efluente industrial. 2. Resina de poliéster. 3 .Bioensaios. 4. α,β -aldeídos insaturados. I. Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Toxicity identification evaluation of polyester resin manufacturing wastewater

Palavras-chave em inglês (Keywords): Industrial wastewater, Polyester resin, Bioassays, α,β -unsaturated aldehydes

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Dione Mari Morita

Gisela de Aragão Umbuzeiro

Edson Aparecido Abdul Nour

José Roberto Guimarães

Ranulfo Monte Alegre

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Lucia Regina Durrant
(Orientadora, FEA-UNICAMP)

Prof^ª Dr^ª Dione Mari Morita
(PHD, POLI-USP)

Prof^ª Dr^ª Gisela de Aragão Umbuzeiro
(SENAC-SP)

Prof Dr Edson Aparecido Abdul Nour
(DSA, FEC-UNICAMP)

Prof Dr José Roberto Guimarães
(DSA, FEC-UNICAMP)

Prof Dr Ranulfo Monte Alegre
(DEA, FEA-UNICAMP)

DEDICATÓRIA

às minhas queridas Mayumi e Gabriela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai e a seu Filho Jesus Cristo, cujo sangue me trouxe a verdadeira liberdade, paz e alegria.

À minha esposa Kátia Mayumi. Sem o seu apoio, incentivo e compreensão o meu trabalho seria infinitamente mais árduo.

Aos meus pais Neiva e Roberto, que sempre me amaram e continuam a fazê-lo.

À minha orientadora Lucia, pelo acolhimento e voto de confiança em relação às pesquisas por mim realizadas durante o período deste doutorado.

À professora Dione Morita, por toda a atenção, amizade e conhecimentos compartilhados nestes últimos anos.

Ao professor Ranulfo Monte Alegre, pela disposição e prontidão em compartilhar os equipamentos de seu laboratório.

Aos professores Edinho e Tuca, pelos ensinamentos durante as aulas ministradas na FEC.

À professora Gisela Umbuzeiro, que me abriu as portas do Laboratório de Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da CETESB para a realização em parceria de etapa importante deste trabalho.

À Célia Rech, da CETESB, pela atenção, ajuda e esclarecimentos em relação ao ensaio de mutagenicidade em *Salmonella*.

Ao colega Roger Wagner, pela disposição e colaboração nas análises cromatográficas.

Ao amigo e irmão Emerson, pela imprescindível ajuda para que eu pudesse terminar este trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pela amizade compartilhada durante os últimos anos.

ÍNDICE GERAL

Resumo _____	xii
Abstract _____	xiii
Introdução _____	1
Justificativa _____	3
Objetivos _____	4
Etapas do estudo _____	5
Revisão Bibliográfica	
<i>Regulamentação relacionada a efluentes industriais</i> _____	7
<i>Efluente da fabricação de resinas de poliéster</i> _____	8
<i>A abordagem orientada por toxicidade</i> _____	9
<i>Referências</i> _____	16
Capítulo 1	
"TOXICITY-DIRECTED APPROACH OF POLYESTER MANUFACTURING INDUSTRY WASTEWATER PROVIDES USEFUL INFORMATION FOR CONDUCTING TREATABILITY STUDIES" _____	19
Abstract _____	20
Introduction _____	21
Materials and Methods _____	23
Results and Discussion _____	27
Conclusions _____	34
References _____	35
Capítulo 2	
"IDENTIFICATION OF α,β -UNSATURATED ALDEHYDES AS RESPONSIBLE FOR TOXICITY TO ACTIVATED SLUDGE BIOMASS IN A POLYESTER MANUFACTURING INDUSTRY WASTEWATER USING A TOXICITY-DIRECTED APPROACH" _____	37
Abstract _____	38
Introduction _____	39
Materials and Methods _____	40
Results and Discussion _____	43
Conclusions _____	49
References _____	50
Anexos _____	53
Capítulo 3	
"EVIDÊNCIAS DA VOLATILIZAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS PRESENTES EM UM EFLUENTE DA FABRICAÇÃO DE RESINAS DE POLIÉSTER DURANTE TRATAMENTO AERÓBIO" _____	78

<i>Resumo</i> _____	79
<i>Introdução</i> _____	80
<i>Materiais e métodos</i> _____	82
<i>Resultados e discussão</i> _____	87
<i>Conclusões</i> _____	92
<i>Referências</i> _____	93
Capítulo 4	
“DIFFERENCE ON THE OBSERVED ACUTE TOXIC EFFECT OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN POLYESTER MANUFACTURING WASTEWATER TO AEROBIC AND ANAEROBIC TREATMENT PLANT BIOMASSES” _____	95
<i>Abstract</i> _____	96
<i>Introduction</i> _____	97
<i>Materials and Methods</i> _____	99
<i>Results</i> _____	102
<i>Discussion</i> _____	104
<i>Conclusions</i> _____	105
<i>References</i> _____	106
Conclusões finais _____	107

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Esquema geral da abordagem orientada por toxicidade utilizada neste estudo	11
---	----

Capítulo 1

Table 1. Physical and chemical effluent characterization	27
---	----

Table 2. Effluent fractionation respirometric test results. OUR _t : tested solution oxygen uptake rate; OUR _c : control oxygen uptake rate; I _f : inhibition of control respiration by fraction; I _b : inhibition of control respiration by baseline effluent; IR: toxicity reduction by fractionation procedure	29
---	----

Figure 1. Superposition of wastewater headspace chromatograms in pH 3 (traced line) and in pH 11 (continued line). [1] VOCs stripped in pH 3 but not significantly stripped in pH 11; [2] VOCs stripped in both pH 3 and 11; [3] VOCs stripped only in pH 11	31
---	----

Table 3. Effluent fractionation respirometric test results of second experiment. OUR _t : tested solution oxygen uptake rate; OUR _c : control oxygen uptake rate; I _f : inhibition of control respiration by fraction; I _b : inhibition of control respiration by baseline effluent; IR: toxicity reduction by fractionation procedure	32
--	----

Capítulo 2

Table 1. Toxicity reduction observed after each wastewater fractionation	43
---	----

Figure 1. Superposition of pH 11 chromatogram (continued line) and pH 3 chromatogram (traced line) showing [A] compounds of interest and [B] excluded compounds	44
--	----

Figure 2. Superposition of pH 11 chromatogram (continued line) and stripped chromatogram (traced line) showing [A] compounds of interest and [B] excluded compounds	44
--	----

Table 2. Compounds of interest list, showing areas and retention times in headspace GC/MS analyses and mass spectra library matches. Compounds were ordered by area size. (nd) not detected in chromatogram. (-) no reasonable match in mass spectra library	45
---	----

- Table 3.** Calculated and databases Kováts Indexes (KI) for compounds which had reasonable mass spectra library matches _____ 46
- Table 4.** Mutagenic potency and 90 % confidence intervals calculated by the Bernstein model in SALANAL computer program _____ 47
- Figura 3.** Comparação de cromatogramas: headspace em pH 11 (linha contínua) e headspace em pH 3 (linha tracejada) _____ 54
- Figura 4.** Comparação de cromatogramas: headspace em pH 11 (linha contínua) e headspace após 9 horas de arraste com ar em pH 11 (linha tracejada) _____ 54
- Figura 5.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-butenal [M] (no alto) e do COV #2, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 56
- Figura 6.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-butenal (no alto) e do COV #3, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 56
- Figura 7.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2,4-heptadienal (no alto) e do COV #8, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 57
- Figura 8.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-propenal (no alto) e do COV #10, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 57
- Figura 9.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-butenal [R] (no alto) e do COV #11, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 58
- Figura 10.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-pentenal (no alto) e do COV #12, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 58
- Figura 11.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-etil 2-butenal (no alto) e do COV #13, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 59
- Figura 12.** Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-pentenal (no alto) e do COV #15, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 59

Figura 13. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-etenil 2-butenal (no alto) e do COV #18, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 60

Figura 14. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2,4-hexadienal (no alto) e do COV #20, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 60

Capítulo 3

Figura 1. Proporções anuais observadas e utilizadas para compôr o efluente combinado _____ 81

Tabela 1. Descrição dos pré-tratamentos realizados antes dos testes de toxicidade _____ 82

Figura 2. Material utilizado nos testes respirométricos de toxicidade, da esquerda para a direita em sentido horário: medidor de oxigênio dissolvido; agitador magnético; garrafa com capacidade para 500 mL; bomba de ar e mangueira com ponteira de pedra porosa; cronômetro _____ 84

Tabela 2. Resultados das análises físicas e químicas realizadas _____ 87

Tabela 3. Resultados dos testes respirométricos de toxicidade após fracionamentos. TUO_i: taxa de respiração observada com o respectivo fracionamento; TUO_c: taxa de respiração observada com a solução controle ; I_i: inibição da respiração observada no controle causada pelo efluente fracionado; I_b: inibição da respiração observada no controle causada pelo efluente bruto; RI: redução da inibição devido ao fracionamento _____ 88

Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas de COVs em pH 3 (linha tracejada) e em pH 11 (linha contínua). [1] COVs volatilizados em pH 3 mas não significativamente em pH 11; [2] COVs volatilizados em pH 3 e 11; [3] COVs volatilizados somente em pH 11 _____ 89

Tabela 4. Resultados de DQO (mg/L), SSV (mg/L) e eficiência (%) na remoção de DQO obtidos no ensaio de biodegradação / volatilização _____ 90

Figura 4. Comparação dos espectros de massas do padrão da 2-etilacroleína (no alto) e do COV presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados _____ 91

Capítulo 4

Table 1. α,β -Unsaturated aldehydes identified among VOCs in a polyester manufacturing wastewater _____	97
Figure 1. Headspace GC analysis of wastewater in the beginning (continued line) and at the end (traced line) of air stripping which removed a series of α,β -unsaturated aldehydes. Chromatographic methods are described elsewhere _____	98
Figure 2. Scheme of the study _____	99
Figure 3. Anaerobic gas production measurement system _____	101
Figure 4. Biomass OURs (slopes) obtained with wastewater before and after fractionation (■ Original Wastewater; ● Fractionated Wastewater) _____	102
Figure 5. Anaerobic gas production bioassay results. (■ Original Wastewater; ● Fractionated Wastewater). Mean values. Error bars show standard deviations _____	103

RESUMO

Os processos industriais são geradores de uma ampla variedade de contaminantes que estão presentes nas águas residuárias. A seleção de processos de tratamento baseia-se nas características do efluente a ser tratado.

Neste trabalho investigou-se um efluente tóxico da fabricação de resinas de poliéster. Existem poucas informações na literatura sobre este tipo de água residuária. Procedeu-se a caracterização do efluente, efetuando-se a avaliação e identificação de constituintes tóxicos presentes no mesmo por meio de uma abordagem orientada por toxicidade.

Foi utilizado bioensaio respirométrico em lodo ativado para avaliar a toxicidade do efluente bruto. Então, foram efetuados tratamentos físicos e químicos para fracionamento do efluente, e após cada um deles, realizou-se o mesmo bioensaio. Dessa maneira, avaliou-se qual técnica de fracionamento foi a mais efetiva na redução da toxicidade.

A maior redução de toxicidade foi observada após o fracionamento do efluente por arraste com ar em pH 11 (62,5 %). Este resultado demonstrou que uma fração significativa da toxicidade do efluente para lodos ativados era causada por compostos orgânicos volatilizados em pH 11. Isso indica que o tratamento do efluente por arraste com ar em pH básico pode ter impacto positivo em um tratamento biológico aeróbio subsequente.

Uma vez determinado o tipo de compostos no efluente que provocam efeitos tóxicos (Compostos Orgânicos Voláteis - COVs), procedeu-se a esforços analíticos visando à identificação dos mesmos. Análises por *headspace* do efluente por cromatografia gasosa e espectrometria de massa identificaram a presença de aldeídos insaturados (congêneres de acroleína). Tais compostos tinham relação direta com o efeito tóxico observado.

Foram também realizados bioensaios utilizando microrganismos anaeróbios. Para tanto, mediu-se o volume de gás produzido por uma biomassa anaeróbia em contato com o efluente bruto e com o efluente fracionado por arraste com ar em pH 11. Não se observou redução na toxicidade do efluente mesmo com este fracionamento. Comparando-se esses resultados aos obtidos com lodo ativados, foi verificado que os compostos removidos por arraste com ar em pH 11 não apresentaram o mesmo grau de toxicidade para esta biomassa anaeróbia. Tais resultados indicam que a utilização de processo de tratamento biológico anaeróbio seria uma opção adequada para a condução de futuros estudos de tratabilidade deste efluente.

Os resultados obtidos neste trabalho de avaliação e identificação de toxicidade em efluente da fabricação de resinas de poliéster ratificam a abordagem utilizada como uma valiosa ferramenta na caracterização de efluentes industriais tóxicos, principalmente nos casos onde não se encontram disponíveis informações específicas relacionadas ao efluente estudado.

ABSTRACT

Industrial processes generate a vast range of contaminants that are present in wastewaters. Treatment process selection is based on wastewater characteristics.

In this work a toxic polyester resin manufacturing wastewater was investigated. Specific literature on this kind of wastewater is rare. The characterization of this wastewater was conducted, evaluating and identifying toxicity by applying a toxicity-oriented approach.

An activated sludge respirometric bioassay was used to assess effluent toxicity. Then, physical and chemical treatments were performed for effluent fractionation. After each fractionation, the same bioassay was conducted. In this way, it was assessed which fractionation technique was the most effective in reducing effluent toxicity.

The greater toxicity reduction was observed after effluent fractionation with air stripping in pH 11 (62.5 %). This result showed that a significant fraction of wastewater toxicity for activated sludge was caused by organic compounds volatilized in pH 11. This indicates that effluent treatment by air stripping in basic pH could have a positive impact in a conjugated aerobic biological treatment.

Once the type of compounds causing wastewater toxicity has been determined (Volatile Organic Compounds – VOCs), analytical efforts aiming the identification of these compounds were made. Wastewater headspace gas chromatographic analyses coupled with mass spectrometry identified the presence of α,β -unsaturated aldehydes (acrolein congeners). These compounds were directly related to the observed toxic effect.

Bioassays using anaerobic microorganisms were also conducted. To that purpose, the volume of gas produced by an anaerobic biomass in contact with the baseline effluent and with the fractionated effluent by air stripping in pH 11 was measured. No toxicity reduction was observed with this fractionation. By comparing this result with the one obtained with the respirometric bioassay, it was found that the compounds removed by air stripping in pH 11 did not inhibit this kind of biomass in the same degree which they inhibited activated sludge. This indicates that the use of an anaerobic treatment process would be an adequate option for conducting future treatability studies in this wastewater.

The results obtained in this research of toxicity identification evaluation of a polyester resin manufacturing effluent confirm that the toxicity-oriented approach is a valuable tool for the characterization of toxic industrial wastewaters, especially in cases when specific information related to the studied wastewater is lacking.

INTRODUÇÃO

Outrora tida como um recurso ilimitado, o uso indiscriminado e poluição dos recursos hídricos têm levado a projeções de escassez de água para uma parcela significativa da população mundial em um futuro não muito distante.

A falta de água não se traduz apenas por ausência da mesma. É possível haver escassez de água mesmo quando existe a presença de grandes quantidades desse elemento. Isso ocorre quando a água disponível encontra-se poluída, limitando assim o seu uso. Dependendo do grau e tipo de poluição, o uso da água para fins mais nobres pode se tornar inviável ou até mesmo perigoso.

Esse quadro certamente será refletido na qualidade da água disponível para as indústrias de alimentos. O elevado padrão de qualidade da água utilizada nos processos produtivos das indústrias alimentícias não pode ser rebaixado. A necessidade de tratamentos cada vez mais complexos para se atingir tal padrão pode onerar toda a cadeia produtiva, encarecendo assim o produto final.

O crescimento demográfico e a industrialização, observados no século passado, deixaram como legado aos que no século atual vivem a preocupação cada vez maior com o meio ambiente. Esforços praticados já no final do século XX, como a Rio 92 e a Conferência de Quioto, demonstraram que a poluição do ecossistema global é uma realidade e precisa ser encarada com seriedade por todos.

O problema da poluição do meio ambiente é tão amplo que há a necessidade de um esforço conjunto e multidisciplinar para desmembrá-lo, trabalhá-lo e quiçá resolvê-lo. É para tal objetivo que contribui o presente trabalho, procurando oferecer subsídios relevantes para o controle de poluição da água no âmbito dos processos produtivos industriais.

Os processos industriais são geradores de uma ampla variedade de contaminantes que estão presentes nas águas residuárias. As características destas águas residuárias variam significativamente de uma indústria para outra, mesmo no caso de indústrias pertencentes a uma mesma categoria (por exemplo, a indústria química orgânica).

As características dos efluentes industriais podem inclusive variar muito até mesmo no caso de diferentes linhas de produção dentro de uma mesma indústria. Somam-se a essa variação as flutuações diárias de vazão, temperatura e composição. Juntos, esses fatores criam um desafio para o controle de poluição de água que é único para cada unidade industrial considerada.

A seleção do processo de tratamento deve basear-se em características relevantes do efluente, nas regulamentações aplicáveis e em análises de custo-benefício (Eckenfelder, 2000). Após um levantamento criterioso dos processos na indústria geradores de despejos que necessitam de tratamento, uma amostra representativa deve ser caracterizada.

O trabalho aqui apresentado é um estudo de caso em uma indústria produtora de resinas plásticas de poliéster que gera um efluente tóxico decorrente dos processos de polimerização. Existem poucas informações na literatura sobre este tipo de água residuária. Espera-se com este trabalho contribuir para a área de controle de poluição de água na indústria.

Procedeu-se a caracterização do efluente estudado por meio de determinação de parâmetros físicos e químicos convencionais e de matéria orgânica no efluente. Além disso, avaliou-se os constituintes tóxicos do efluente por meio de uma abordagem orientada por toxicidade. Este tipo de abordagem, apesar de já estar consolidada em países desenvolvidos, ainda é pouco utilizada no Brasil.

A caracterização de um efluente direcionada por toxicidade não é baseada em análises químicas específicas definidas *a priori*. Ao contrário, são utilizados bioensaios tanto no efluente bruto como no efluente fracionado por meio de diferentes tratamentos, onde elementos conhecidos são removidos (ex: compostos voláteis, metais potencialmente tóxicos, etc.). Os resultados dos bioensaios direcionam os esforços analíticos no sentido da identificação dos constituintes mais tóxicos da amostra.

Com base nas características relevantes determinadas por este tipo de abordagem, é possível direcionar estudos de tratabilidade de um efluente sobre o qual pouco se conhece, evitando assim o empiricismo.

Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho encorajem a aplicação deste tipo de abordagem em outras indústrias geradoras de efluentes tóxicos, quando informações específicas sobre seus efluentes sejam igualmente escassas. Acredita-se que esta situação não será incomum se o controle da poluição de água na indústria for encarado caso a caso.

JUSTIFICATIVA

O presente trabalho teve como ponto de partida um problema real relacionado ao controle de poluição de água na indústria.

Uma indústria química orgânica localizada na região de Campinas, com a qual o autor tinha contato, enviava seus efluentes decorrentes dos processos produtivos para tratamento em uma grande estação de uma concessionária da região. Após algum tempo, a concessionária sinalizou uma imposição de limites particulares para este efluente, sobretaxando a empresa quando a DQO do mesmo ultrapassasse determinado valor.

Os efluentes dessa indústria são decorrentes da fabricação de resinas plásticas de poliéster. O mesmo é uma mistura de diversas águas de processo resultantes de reações de esterificação que diferem entre si quanto às matérias-primas utilizadas. As principais finalidades dos produtos são as manufaturas de solados de calçados e de adesivos.

Uma vez que o efluente possui alta carga orgânica, era freqüente a violação dos limites impostos pela concessionária. O tratamento do efluente se tornou um incômodo financeiro para a indústria, pois além das taxas cobradas para a disposição, existia também o custo com o transporte do mesmo até a estação de tratamento.

Iniciou-se então um processo de busca por alternativas que culminou na contratação de uma consultoria para que se projetasse e construísse uma estação de tratamento no local da empresa. Após coletas e testes com o efluente, foi projetada uma estação de tratamento de lodo ativado, que atualmente encontra-se em construção.

Por meio do contato que tinha na indústria, o autor tomou conhecimento da dificuldade encontrada pela empresa contratada nos estudos de tratabilidade do efluente, sendo observada significativa toxicidade do mesmo.

Com base nestas informações e no pouco conhecimento existente sobre este tipo de efluente, decidiu-se pela realização de estudos aprofundados sobre o problema, em nível acadêmico.

De fato, ao longo do estudo, pouco se encontrou de literatura específica sobre os efluentes desse tipo de indústria. Não foi possível, como seria no caso de outras categorias industriais com tecnologias de tratamento mais consolidadas, determinar *a priori* quais processos de tratamento seriam os mais indicados. Essa determinação foi dificultada, em grande parte, pela falta de conhecimento sobre as fontes e a natureza da toxicidade presente no efluente.

Justifica-se portanto a caracterização aprofundada do efluente em questão, o que abrange a avaliação e identificação da toxicidade no mesmo. Este estudo contribui para a área de controle de poluição de água na indústria, pois agrega conhecimento sobre um tipo de efluente ainda pouco estudado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Realizar a caracterização do efluente de uma indústria produtora de resinas de poliéster utilizando uma abordagem orientada por toxicidade;

Objetivos específicos

- Caracterizar o tipo de constituinte(s) no efluente que causa(m) toxicidade a uma biomassa de tratamento biológico aeróbio;
- Identificar no efluente substâncias químicas responsáveis por este efeito tóxico;
- Direcionar a seleção de processos de tratamento adequados ao efluente estudado.

ETAPAS DO ESTUDO

O primeiro passo do presente trabalho foi a realização de um levantamento detalhado da produção de efluentes na planta industrial. O efluente é formado pela mistura de diversas águas de processo, formadas em reações em batelada. A vazão de cada linha é variável e dependente da demanda de mercado.

Optou-se então pelo levantamento do volume de produtos produzidos, sabendo-se que tais informações são diretamente proporcionais à produção de efluentes. Com base nestas informações, foram feitas as coletas das águas de processo escolhidas, e composto um efluente representativo para caracterização. Detalhes sobre os procedimentos encontram-se nas seções de materiais e métodos dos capítulos 1 e 3.

Os passos subseqüentes tiveram como objetivo a determinação de características significativas do efluente. Foram realizadas análises para determinação da matéria orgânica e análises convencionais para outros parâmetros físicos e químicos. Não foi possível concluir quais eram especificamente as fontes de toxicidade do efluente somente com base nestas análises.

Utilizou-se então a abordagem orientada por toxicidade para avaliar e identificar a toxicidade no efluente, aprofundando assim a caracterização do mesmo. Os testes foram concebidos de modo a se conseguir informações importantes sobre diversos aspectos, mencionados a seguir:

- 1) Mensuração da toxicidade do efluente aos microrganismos típicos de lodo ativado, não adaptados e após fase de adaptação;
- 2) Determinação das características físicas e/ou químicas dos compostos tóxicos presentes no efluente;
- 3) Informações sobre a eficácia de uma série de técnicas de fracionamento (tratamentos físicos e químicos da amostra) na diminuição do efeito tóxico observado aos microrganismos de lodo ativado;

Os resultados obtidos nesta fase serviram como base de todos os passos subseqüentes da pesquisa. No capítulo 1 está descrita esta etapa da pesquisa.

Através da observação do efeito tóxico dos compostos retirados com a técnica de fracionamento mais efetiva, questionou-se se esses mesmos compostos também inibiriam em grau semelhante uma biomassa anaeróbia. Foram então concebidos e realizados os testes cujos resultados encontram-se no capítulo 4.

Uma vez que um processo de tratamento biológico aeróbio foi a escolha da indústria em questão para tratamento deste efluente, e que foi verificado que compostos voláteis exerciam efeito tóxico sobre os microrganismos, procedeu-se um

ensaio de biodegradação / volatilização, onde simulou-se o tratamento do efluente com aeração. Foi verificado que existem evidências da volatilização de compostos tóxicos se o efluente for enviado sem pré-tratamento para um tanque de aeração. Esses resultados encontram-se no capítulo 3.

Com o intuito de identificar COVs tóxicos presentes no efluente, procedeu-se a análises por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (CG/EM). Como foi verificado que os compostos mais tóxicos eram volatilizados em pH 11 mas não significativamente em pH 3 (original do efluente bruto), delineou-se um experimento onde foi analisado o *headspace* do efluente em pH 3, em pH 11 e após o fracionamento por arraste com ar em pH 11.

O objetivo era verificar se havia diferença nos compostos volatilizados em condições ácidas e básicas. Essa era a suspeita e tal fato foi confirmado. Havia compostos que não foram detectados em pH 3, e apareceram no cromatograma da análise em pH 11. A análise do *headspace* do efluente após o fracionamento por arraste com ar em pH 11 tinha o intuito de verificar se tais compostos eram mesmo removidos. De fato, os compostos que foram observados em pH 11 e não em pH 3, já não estavam mais presentes após este fracionamento.

Procedeu-se então aos estudos descritos detalhadamente no capítulo 2, onde o objetivo era a identificação dos compostos suspeitos de causar a toxicidade à biomassa aeróbia observada. Foram identificados uma série de compostos pertencentes à mesma classe, a saber, aldeídos insaturados.

Um levantamento na literatura sobre essa classe de compostos deixou claro que se tratavam de compostos com atividade mutagênica no teste com *Salmonella* (teste de Ames). Ora, se estes compostos eram retirados do efluente com o pré-tratamento de arraste com ar em pH 11, mas não com arraste com ar em pH 3, deveria haver diferença na atividade mutagênica do efluente após um e outro fracionamento.

A última fase da pesquisa foi o ensaio de mutagenicidade descrito no capítulo 2, onde procurou-se confirmar a identificação dos aldeídos insaturados como um grupo. Foi feito fracionamento por arraste com ar em pH 11 em uma amostra e por arraste com ar em pH 3 em outra amostra de efluente. Estas duas amostras foram testadas quanto à sua atividade mutagênica. A amostra que sofreu fracionamento em pH 11 apresentou menor atividade mutagênica do que a amostra que sofreu fracionamento em pH 3, confirmando assim a identificação dos aldeídos insaturados como um grupo causador de efeito tóxico sobre microrganismos de lodo ativado.

Com base nos resultados obtidos na avaliação e identificação da toxicidade deste efluente, foram feitas, ao longo da apresentação do trabalho, considerações sobre a seleção dos processos de tratamento que seriam adequados ao mesmo. Por se tratarem somente de resultados de caracterização, devem ser utilizados para nortear subsequentes estudos de tratabilidade do efluente. Esses estudos devem envolver ensaios mais prolongados e em maior escala, gerando assim dados suficientes para conclusões definitivas sobre o tratamento de efluentes deste tipo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Regulamentação relacionada a efluentes industriais

Durante os últimos 30 anos, o cenário do controle de poluição industrial tem passado por uma vasta transformação. As formas de regulamentação têm evoluído, juntamente com as tecnologias aplicáveis, no sentido de se garantir uma qualidade de água cada vez melhor. Ao longo do caminho, foram impostas limitações a contaminantes específicos nos efluentes industriais, bem como à toxicidade destes efluentes como um todo. O desafio hoje é o atendimento dessas novas limitações de uma forma que seja aceitável ambientalmente, e ao mesmo tempo, economicamente viável (Eckenfelder, 2000).

Nos EUA, são estabelecidos limites de emissão de determinados compostos por categoria industrial, de acordo com a regulamentação "Federal Industry Point Source Category Limits". Os limites dos parâmetros convencionais (ex.: sólidos, concentração de matéria orgânica, etc.) são baseados em massa de contaminantes por matéria-prima processada (ex: indústria de celulose e papel) ou por concentração (ex.: indústria farmacêutica). Os contaminantes não convencionais (metais e poluentes prioritários) possuem limites baseados em concentração, de acordo com a categoria industrial (Eckenfelder, 2000).

Existem também regulamentações regionais (ex.: "Great Lakes Initiative"), estaduais (ex.: Q_{7,10} para classificação de uso de corpo receptor) e locais. Estas últimas são denominadas "Local Limits". Estes limites são requeridos além daqueles por categoria industrial, para assegurar o cumprimento da legislação nos efluentes das estações de tratamento públicas que recebem tais efluentes industriais (USEPA, 2003).

No Brasil, o lançamento dos efluentes industriais são regulamentados na esfera federal pela Resolução Nº 357, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 17 de março de 2005. O CONAMA 357 limita a concentração de parâmetros convencionais e alguns contaminantes não convencionais nos efluentes lançados, porém, sem distinção quanto ao tipo de indústria. Limita também a concentração de diversos outros contaminantes e compostos específicos nos corpos receptores, e determina que tais concentrações não sejam alteradas por qualquer tipo de lançamento.

No Estado de São Paulo, o Decreto 8.468, que regulamenta a Lei nº 997 de 1976, limita o lançamento dos efluentes principalmente quanto aos parâmetros convencionais e metais para lançamento em corpo receptor (Art. 18). O lançamento em rede coletora pública (Art. 19 A), baseado em menos parâmetros, tem limites menos restritivos. Estes despejos devem seguir para posterior tratamento em estações de grande porte.

A Resolução da Secretaria do Meio Ambiente nº 3 de 2000 apresentou uma inovação na regulamentação de efluentes, estabelecendo o controle do efluente

como um todo através de limites de toxicidade permissível, caso a caso. No entanto, este controle somente é determinado para lançamentos em corpo receptor, não sendo exigido para lançamento em rede pública. Em 2005, o CONAMA 357 também adotou o controle toxicológico nos efluentes para regulamentação do lançamento dos mesmos em determinadas situações.

Contaminantes não convencionais tóxicos presentes em águas residuárias industriais, geralmente não regulamentados na legislação, podem inibir a atividade biológica da biomassa de estações de tratamento, causar dano ao sistema e passar pela estação sem serem retidas ou transformadas, finalmente chegando a algum corpo receptor (Ren, 2004).

Há também a possibilidade de volatilização de compostos tóxicos na rede coletora, tanques de sedimentação e aeração, antes de serem biodegradados. Substâncias tóxicas podem também ser acumuladas no lodo produzido pela estação, gerando risco potencial para operadores e para a saúde pública, bem como causando problemas para a disposição final deste resíduo (USEPA, 1982).

Apesar do grande esforço de alguns, ainda não existe regulamentação nacional consolidada que seja similar aos limites locais americanos. Estes são aplicados caso a caso, levando em conta contaminantes perigosos não convencionais e também a toxicidade dos efluentes como um todo. Isso permitiria a proteção, tanto das estações de tratamento que recebem efluentes industriais, quanto da atmosfera e da qualidade dos recursos hídricos nacionais.

Efluentes da fabricação de resinas de poliéster

As resinas de poliéster são obtidas por meio da polimerização de diferentes monômeros em condensações catalisadas em meio ácido (Romero *et al.*, 1998). Os monômeros utilizados são geralmente glicóis e ácidos orgânicos (Swift, 1994). Dentre os glicóis mais utilizados estão o etilenoglicol, dietilenoglicol, propilenoglicol e 1,4-butanodiol. Os ácidos orgânicos utilizados podem ser os ácidos adípico, tereftálico ou isoftálico, dentre outros (ABIQUIM, 2004).

O efluente de processos para produção de resinas de poliéster consiste em água produzida durante a reação de esterificação, contaminada com subprodutos desta reação (Minor, 1974). A formação desses subprodutos deve-se, entre outros, à decomposição térmica de glicóis (Brown and Dougherty, 1948). Pode ocorrer a formação de aldeídos devido à desidratação de dióis vicinais em meio ácido (Romero *et al.*, 1998).

É sabido que a indústria química orgânica é de grande importância em termos de impactos ambientais, e que seus efluentes podem apresentar alta carga orgânica, bem como substâncias tóxicas. No entanto, informações específicas na literatura sobre as características significativas de efluentes da fabricação de resinas de poliéster são

raras e as caracterizações já realizadas basearam-se em análises físicas e químicas de parâmetros convencionais (Meriç *et al.*, 1999; Tünay *et al.*, 1994).

Uma das principais preocupações das indústria produtoras de resinas de poliéster são substâncias causadoras de odor liberadas na atmosfera pelo processo de produção (Cocheo *et al.* 1991). Em estudo neste tipo de indústria, foi verificado que além do próprio processo produtivo, a estação de tratamento de efluentes contribuía significativamente para a transferência de compostos voláteis causadores de odor para a atmosfera (Tutt, 1991).

Os efluentes da fabricação de resinas de poliéster já foram relacionados à episódios de contaminação de água de abastecimento causada por substâncias com odor objetável nos EUA (Preti *et al.*, 1993; Schweitzer *et al.*, 1999) e na Espanha (Romero *et al.*, 1998). Estas substâncias foram identificadas como 1,3-dioxanos e derivados. O tratamento dos efluentes nas indústrias responsáveis teve de ser reavaliado. Na Espanha, as tecnologias adotadas para eliminação destes compostos foram adsorção com carvão ativado e processos oxidativos avançados.

A complexidade do tipo de efluente em questão pode ser percebida em alguns estudos de tratabilidade documentados na literatura, onde encontrou-se sempre dificuldade na aplicação de tratamento biológico nos casos estudados (Bertanza *al.*, 2001; Tünay *et al.*, 1994; Meriç *et al.*, 1999). Os autores destes trabalhos invariavelmente valeram-se de diferentes técnicas de oxidação química para estudar a tratabilidade do efluente, juntamente ou não com processos biológicos.

Nenhum dos estudos citados avaliou ou identificou as fontes de toxicidade de efluentes da fabricação de resinas de poliéster. Este autor desconhece trabalho realizado até o momento que tenha levado em conta o este aspecto e seu impacto no sentido de direcionar a seleção de tecnologias de tratamento aplicáveis para o design de estudos de tratabilidade.

A agência ambiental americana (USEPA) sumarizou informações ambientalmente relevantes para o controle de poluição em 18 diferentes setores industriais ("Sector Notebook Project"). No volume que contém as informações sobre a indústria de resinas plásticas (USEPA, 1997), são listados 410 compostos químicos reportados por diversas indústrias do setor como presentes em seus efluentes. Estes seriam potenciais contaminantes presentes no efluente estudado. Porém, analisar o efluente mesmo quanto uma fração destes compostos envolveria custos elevados. Mesmo que isso fosse feito, existiria ainda a possibilidade de não se poder estabelecer uma relação direta entre os resultados obtidos nestas análises químicas específicas e a toxicidade observada no efluente.

A abordagem orientada por toxicidade

Conceito

A caracterização de efluentes industriais com a intenção de limitar seu impacto ambiental inicialmente se baseava em fatores físicos como sólidos em suspensão, cor e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Mais tarde, compostos tóxicos de interesse especial começaram a ser monitorados por meio de análises químicas específicas, principalmente de contaminantes que a agência ambiental americana definiu como prioritários (Burkhard and Ankley, 1989).

No entanto, análises químicas específicas podem falhar completamente em reconhecer os constituintes responsáveis pela toxicidade de um dado efluente, pois os contaminantes tóxicos a serem analisados devem ser definidos previamente (Reemtsma, 2001). É bem possível que os principais causadores do efeito tóxico observado sejam contaminantes não usuais, não considerados na definição das análises. Além disso, análises químicas específicas não discriminam os efeitos das interações entre os contaminantes presentes.

A análise de toxicidade de efluentes como um todo, utilizando bioensaios, é uma alternativa bem estabelecida às análises químicas específicas. O efeito tóxico de interações entre componentes de uma amostra é refletido nos resultados. Porém, sozinhos, os bioensaios não fornecem informações sobre quais compostos estariam causando os efeitos observados. Portanto, não fornecem uma base sólida para medidas de redução de risco como um controle de emissões (Brack, 2003).

No início dos anos 80, cientistas desenvolveram uma nova abordagem chamada “análise orientada por toxicidade”, ou orientada por bioensaios, ou ainda, orientada por efeitos. Esta abordagem combina análises químicas com fracionamentos físicos e químicos da amostra, seguidos de testes de toxicidade (Brack, 2003).

Portanto, uma análise orientada por toxicidade é uma abordagem racional, que permite a focalização dos esforços analíticos nos constituintes mais nocivos de um efluente industrial (Reemtsma, 2001). Na Figura 1 é mostrado o esquema geral de uma abordagem orientada por toxicidade.

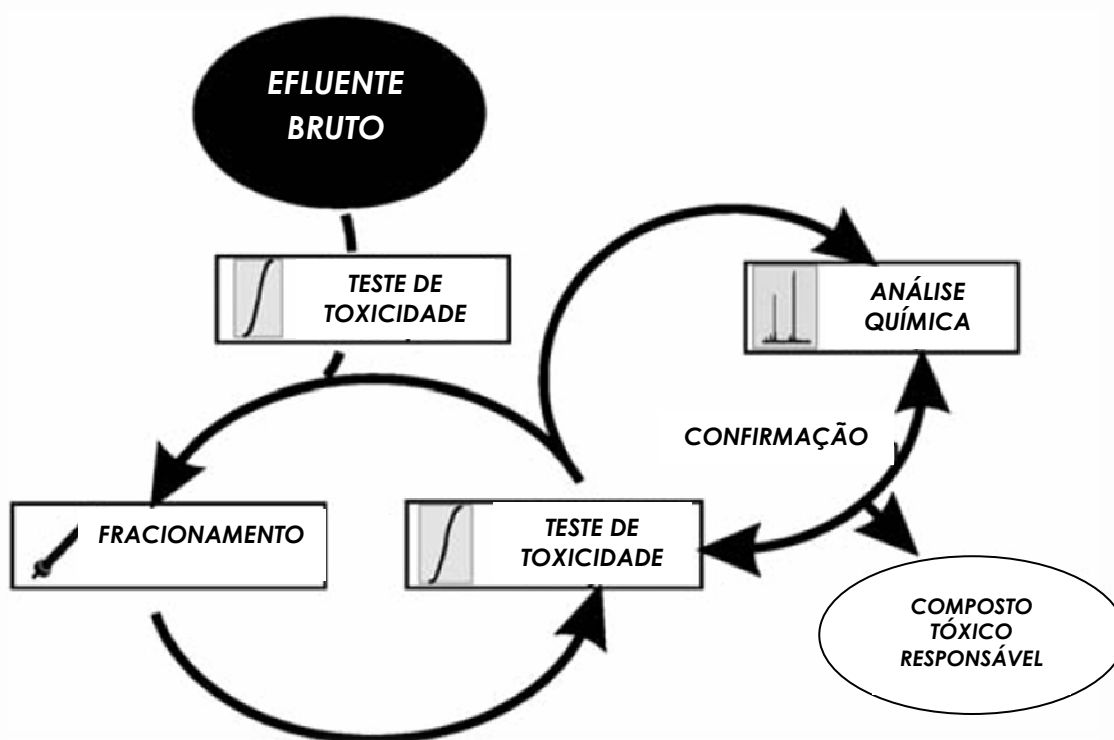


Figura 1. Esquema geral da abordagem orientada por toxicidade utilizada neste estudo (figura adaptada de Brack, 2003).

Técnicas de fracionamento

Exemplos clássicos de abordagem orientada por toxicidade são os protocolos para avaliação e identificação de toxicidade (Toxicity Identification Evaluation – TIE) propostos pela agência ambiental americana para misturas aquosas complexas como efluentes industriais. A primeira fase refere-se à caracterização da toxicidade e envolve técnicas de fracionamento e bioensaios (USEPA, 1988). A segunda fase refere-se à identificação de substâncias causadoras do efeito tóxico observado (USEPA, 1989a) e a terceira fase, à confirmação da identidade destas substâncias (USEPA, 1989b).

Outro protocolo proposto pela USEPA, para avaliação da redução de toxicidade (Toxicity Reduction Evaluation – TRE), consiste na avaliação de diversos tratamentos aplicáveis à efluentes de modo a determinar qual seria o melhor custo benefício nos casos estudados, e envolvem estudos de tratabilidade em maior escala (USEPA, 1989c).

Muitos componentes dos protocolos de TIE e TRE podem ser similares. No entanto, enquanto o alvo do TIE é a caracterização e identificação das fontes de toxicidade, o alvo do TRE é a determinação das tecnologias de tratamento mais

adequadas. Ou seja, os protocolos de TIE podem ser utilizados como guia para a realização de TREs (Hall, 1992). O presente estudo se enquadra na categoria de TIE.

A primeira etapa de tais protocolos consiste na realização de uma série de procedimentos de fracionamento (tratamentos físicos e químicos da amostra) seguidos de um bioensaio, que são feitos sistematicamente para determinar as fontes da toxicidade do efluente e o(s) potencial(is) poluente(s) causador(es). Uma vez que os testes mencionados fornecem informações sobre as propriedades físicas e químicas das mais relevantes substâncias tóxicas em uma dada água residuária, tal conhecimento colabora na avaliação de tecnologias aplicáveis ao tratamento e da mesma (Bitton, 1994).

As técnicas de fracionamento utilizadas são simples, requerendo reagentes e equipamentos relativamente básicos. Se o alvo do fracionamento for a seleção de estratégias de tratamento, deve-se ter em mente o que seria factível e economicamente viável em escala real. Contaminantes perigosos orgânicos e inorgânicos podem ser removidos de efluentes por meio dos seguintes mecanismos: biodegradação, adsorção, volatilização, oxidação química e coagulação, floculação e sedimentação (Tchobanoglous et al, 2003). Contaminantes orgânicos apolares têm tendência a adsorção na biomassa de estações de tratamento. Metais pesados podem ser removidos por agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA). Arraste com ar pode remover compostos orgânicos voláteis (COV) e amônia, neste último caso dependendo do pH. Coagulação química, floculação e sedimentação possibilitam a remoção de metais e orgânicos em concentrações traço, via adsorção. Existem técnicas de fracionamento simples que podem alcançar resultados similares aos obtidos com estes processos de tratamento (Hall, 1992).

As seguintes manipulações no efluente bruto podem ser consideradas, entre outras (Eckenfelder, 2000):

- *Filtração.* É geralmente realizada para que primeiramente se determine se a toxicidade da amostra está relacionada com a fase solúvel ou insolúvel. Tipicamente, filtros de fibra de vidro com aproximadamente 1 µm são utilizados.
- *Quelação de metais.* A toxicidade da soma de todos os metais catiônicos (com exceção do mercúrio) pode ser determinada por adição de agente quelante (EDTA) em diferentes concentrações e avaliando se há mudança na toxicidade.
- *Arraste com ar.* Tratamentos em batelada da amostra por arraste com ar em pH ácido, básico e neutro podem remover essencialmente todos os compostos orgânicos voláteis. Em pH básico, a amônia também é removida.

- *Troca iônica.* A toxicidade inorgânica pode ser estudada por meio da utilização de resinas catiônicas ou aniônicas.

Bioensaios

Diversos bioensaios podem ser utilizados em uma abordagem orientada por toxicidade, e a escolha correta é crítica para que sejam atingidos os objetivos propostos. Existem duas perspectivas principais nesta escolha: (i) bioensaios como um sistema de detecção de substâncias e frações tóxicas e (ii) bioensaios para a avaliação de danos ambientais. No primeiro caso, os critérios de escolha são rapidez, pouco volume requerido, sensibilidade, fornecimento de resultados quantitativos e capacidade de discriminação entre frações tóxicas e não-tóxicas. Em relação à avaliação de danos ambientais, é necessário que o teste possua a habilidade de detectar efeitos agudos e crônicos a baixas concentrações em organismos relevantes para o ecossistema específico em estudo.

Com base nestes critérios, fica evidente que o presente trabalho encaixa-se no primeiro caso, uma vez que os bioensaios foram utilizados somente para detectar as frações tóxicas do efluente.

Os bioensaios mais utilizados em estudos de avaliação de toxicidade de efluentes para sistemas aeróbios de tratamento são os de bioluminescência e de respirometria (Gutiérrez et al, 2002). Estes são preferidos principalmente porque são práticos e de curta duração.

O bioensaio baseado em bioluminescência mais amplamente utilizado é o ensaio Microtox® (Azur Environmental, Carlsbad, CA). O Microtox® é realizado com a bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri*. A luminescência de *V. fischeri* é reprimida na presença de substâncias tóxicas, e portanto este organismo responde à toxicidade emitindo pouca ou nenhuma luz (Ren, 2004).

A base dos testes respirométricos é o fato de que a respiração de organismos de sistemas de lodos ativados é reduzida na presença de substâncias tóxicas. A medida mais comum de respiração bacteriana é a taxa de utilização de oxigênio. Muitos métodos respirométricos estão bem estabelecidos e padronizados já há um bom tempo. Um exemplo é o Teste de Inibição de Lodos Ativados nº 209 da "Organization for Economic Co-operation and Development" (OECD, 1984). Neste ensaio é utilizada uma biomassa de lodo ativado não adaptada à amostra testada. A Taxa de Utilização de Oxigênio (TUO) é função da concentração de oxigênio dissolvido na mistura pelo tempo de exposição dos microrganismos à amostra. Verifica-se a toxicidade por meio de comparações da TUO com a de uma substância conhecida ou meio controle (esgoto sintético).

Um ensaio que utiliza microrganismos de lodos ativados é a melhor escolha no caso estudado, já que estes representam a biomassa que sofrerá o impacto direto

deste efluente industrial quando do término da construção do sistema de tratamento na fábrica que gera o efluente. Testes com a bactéria marinha luminescente *V. fischeri* poderiam também ser utilizados, mas devido a esta bactéria ser originária de um ambiente não relacionado ao caso estudado, os resultados seriam menos representativos.

Análises químicas para identificação de compostos tóxicos

Uma das técnicas disponíveis para a identificação de compostos orgânicos desconhecidos é a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM). A cromatografia gasosa permite boa resolução dos componentes da amostra, enquanto a espectrometria de massa é uma análise que permite a identificação dos compostos (Lukasewycz and Durhan, 1992).

As bibliotecas de espectros de massas são extensas, bem maiores do que qualquer outro tipo de biblioteca de espectros. A única desvantagem do uso de CG/EM é o fato de que nem todos os compostos orgânicos são estáveis o suficiente para serem separados por CG. Nesse caso, a alternativa seria o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) acoplada a detector de massa (Lukasewycz and Durhan, 1992).

A estimativa da toxicidade dos compostos tentativamente identificados por CG/EM é feita através de busca na literatura, em bancos de dados de toxicidade. Deste ponto em diante, a identificação se transforma em um processo de decisão, se o composto suspeito está presente em concentração suficiente para causar o efeito observado. Métodos de confirmação de identidade envolvem o uso de padrões adicionados à amostra, e novas análises confirmatórias (Lukasewycz and Durhan, 1992).

"Sucesso" na utilização deste tipo de abordagem

O conceito da análise orientada por toxicidade não é novo. Apesar disso, tem se questionado se este tipo de abordagem é de fato uma ferramenta poderosa, ou dispendiosa, demorada e com poucas chances de sucesso (Brack, 2003). Isto porque a identificação de compostos químicos que apresentam toxicidade, em matrizes reais, tem se demonstrado uma tarefa desafiante. Muitos estudos têm falhado em identificar a fonte dos efeitos observados e gerado "desapontamento" (Reemtsma, 2001).

Hewitt e Marvin (2005) observaram que cada investigação orientada por toxicidade é uma pesquisa dirigida por uma série de hipóteses, sujeita a muitas incertezas que devem ser consideradas durante o curso do estudo. Esses autores enfatizaram que tais feitos não são triviais, e requerem recursos significativos que incluem infra-estrutura, pessoal e uma equipe multidisciplinar bem treinada.

Posto isso, Hewitt e Marvin (2005) propuseram uma definição mais realista de sucesso neste tipo de investigação, considerando bem sucedido o estudo que é capaz de produzir mais informação sobre a natureza e a causa dos efeitos tóxicos do que se tinha antes do início do mesmo. Dessa maneira, ressaltaram que quase todos os estudos que utilizaram a abordagem orientada por bioensaios atingiram certo nível de sucesso, como por exemplo, a exclusão de algum composto suspeito como causador do efeito observado, e a identificação da classe dos compostos envolvidos na toxicidade da amostra.

Dessa forma, retira-se a ênfase de que uma confirmação completa da estrutura dos agentes químicos causadores dos efeitos observados é necessária para o sucesso da investigação. Esta visão mais realista foi aplicada a um programa canadense de controle de poluição no setor de papel e celulose, aonde o nível de profundidade de cada investigação de causa de toxicidade era ditado pela obtenção de informações suficientes sobre a fonte e a natureza dos efeitos observados. Deste modo, medidas corretivas e preventivas concretas puderam ser tomadas (Hewitt e Marvin, 2005).

Aplicação em efluente da fabricação de resinas de poliéster

A utilização de uma análise orientada por toxicidade é de grande valia no caso de águas residuárias industriais tóxicas, das quais se conhece pouco sobre a causa deste efeito. Tal é o caso do efluente estudado neste trabalho.

Uma vez que o controle de poluição de água deve ser único para cada unidade industrial considerada (Water Environment Federation, 1994), a simples aplicação de uma tecnologia eficaz em outros casos de efluentes tóxicos, (ex: tratamento biológico por lodo ativado), pode não funcionar no caso de uma indústria produtora de resinas de poliéster.

A abordagem orientada por toxicidade, através da caracterização dos compostos tóxicos presentes no efluente, é capaz de direcionar a seleção dos processos de tratamento mais adequados ao mesmo. Caso adotada desde o início da concepção do tratamento, pode poupar grandes transtornos e necessidades posteriores de readequação de todo o sistema, o que economizaria uma infinidade de recursos.

Além disso, esta abordagem também pode, com alguma ajuda, identificar compostos responsáveis pela toxicidade em um efluente de processo produtivo de resinas de poliéster, sobre o qual ainda se conhece muito pouco.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira da Indústria Química - ABIQUIM (2004) Guia da indústria Química brasileira. ABIQUIM. Ano 13. São Paulo.
- Bertanza, G., Collivignarelli, C. e Pedrazzani, R. (2001) The role of chemical oxidation in combined chemical-physical and biological processes: experiences of industrial wastewater treatment. *Water Science and Technology* 44(5), 109-116.
- Bitton, G. (1994) *Wastewater Microbiology*. 1st ed. 478 p. Wiley-Liss, Inc. New York, NY.
- Brack, W. (2003) Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (3), 397-407.
- Brown, R. W. e Dougherty, G. (1948) The thermal decomposition of some polymethylol compounds. *Journal of Organic Chemistry* 13 (2), 173-178.
- Burkhard, L. P. e Ankley, G. T. (1989) Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. *Environmental Science & Technology* 23 (12), 1438-1443.
- Cocheo, V., Boaretto, C., Quaglio, P. e Zannetti, R. (1991) Identification by cryofocusing-gas chromatography-mass spectrometry of odorous cyclic acetals emitted from a polyester resin plant. *Analyst* 116 (12), 1337-1342.
- Eckenfelder Jr, W.W. (2000) *Industrial Water Pollution Control*. 3rd ed. 400 p. Boston: McGraw Hill.
- Gutiérrez, M., Etxebarria, J. e de las Fuentes, L. (2002) Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox® and activated sludge oxygen uptake inhibition. *Water Research* 36 (4), 919-924.
- Hall, W. S. (1992) Introduction to toxicity identification and toxicity reduction evaluations, in: D. L. Ford (Ed.), *Toxicity Reduction: Evaluation and Control*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PA, p. 17-30.
- Hewitt, L.M. e Marvin, C.H. (2005) Analytical methods in environmental effects directed investigations of effluents. *Mutation Research* 589 (3), 208-232.

- Lukasewycz, M. e Durhan, E. (1992) Strategies for the identification of non-polar toxicants in aqueous environmental samples using toxicity-based fractionation and gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 580, 215-228.
- Meriç, S., Kabdasli, I., Tünay, O. e Orhon, D. (1999) Treatability of strong wastewaters from polyester manufacturing industry. *Water Science and Technology* 39 (10-11), 1-7.
- Minor, P.S. (1974) Organic chemical industry's waste waters. *Environmental Science and Technology* 8 (7), 620-625.
- Organization for Economic Co-operation and Development (1984) Activated sludge, respiration inhibition test. Guidelines for Testing of Chemicals, OECD Method 209. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris, France.
- Preti, G., Gittelman, T. S., Staudte, P. B., e Luitweiler, P. (1993) Letting the nose lead the way malodorous components in drinking water. *Analytical Chemistry* 65 (15), 699A-702A.
- Reemtsma, T. (2001) Prospects of toxicity-directed wastewater analysis. *Analytica Chimica Acta* 426, 279-287.
- Ren S. (2004) Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. *Environment International* 30 (8), 1151-1164.
- Romero, J., Ventura, F., Caixachand, J. Rivera, J. Godé, L. X. e Ninerola, J. M. (1998) Identification of 1,3-Dioxanes and 1,3-Dioxolanes as Malodorous Compounds at Trace Levels in River Water, Groundwater, and Tap Water. *Environmental Science and Technology* 32, 206-216.
- Schweitzer, L., Noblet, J., Ye, Q., Ruth, E. e Suffet, I. H. (1999) The Environmental Fate and Mechanism of Formation of 2-Ethyl-5,5'-Dimethyl-1,3-Dioxane (2EDD) - a Malodorous Contaminant in Drinking Water. *Water Science and Technology* 40 (6), 217-224.
- Swift, G. (1994) Water soluble polymers. *Polymer Degradation and Stability* 45 (2), 215-231.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L. e Stensel, H.D. (2003) Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4th ed.. Metcalf and Eddy, Inc. McGraw Hill, Boston.

- Tünay, O., Erden, S., Orhon, D. e Kabdasli, I. (1994) Treatability of 2,4-D production wastewater. *Water Science and Technology* 30, 73-78.
- Tutt, W. E. (1991) Successful application of odor control technology at a polyester resin manufacturing facility. 84th Annual Meeting of the Air and Waste Management Association, Vancouver, B.C. (Canada), 16-21 Jun 1991.
- United States Environmental Protection Agency (1982) Fate of priority pollutants in publicly owned treatment works. Final report. v. 1-2. USEPA, Washington DC.
- United States Environmental Protection Agency (1988) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase I. Toxicity Characterization Procedures. USEPA, Duluth, MN.
- United States Environmental Protection Agency (1989a) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase II. Toxicity Identification Procedures. USEPA, Duluth, MN.
- United States Environmental Protection Agency (1989b) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase III. Toxicity Confirmation Procedures. USEPA, Duluth, MN.
- United States Environmental Protection Agency (1989c) Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants. Office of Research and Development, Risk Reduction Engineering Laboratory, Cincinnati, Ohio.
- United States Environmental Protection Agency – USEPA (1997) EPA Office of Compliance Sector Notebook Project: Profile of the plastic resin and manmade fiber industries, USEPA, Washington, DC.
- United States Environmental Protection Agency (2003) EPA'S National Pretreatment Program, 1973-2003: Thirty Years of Protecting the Environment. Office of Water. USEPA, Washington DC.
- Water Environment Federation (1994) Pretreatment of Industrial Wastes. Manual of Practice for Water Pollution Control No. FD-3. WEF, Alexandria, VA.

CAPÍTULO 1

Toxicity-directed approach of polyester manufacturing industry
wastewater provides useful information for conducting
treatability studies

Journal of Hazardous Materials

Enviado para publicação em 2007

Toxicity-directed approach of polyester manufacturing industry wastewater provides useful information for conducting treatability studies

Abstract

A broader characterization of industrial wastewaters, especially in respect to hazardous compounds and their potential toxicity, is often necessary in order to determine the best practical treatment (or pretreatment) technology available to reduce the discharge of harmful pollutants to the environment or publicly owned treatment works. Using a toxicity-directed approach, this paper sets the base for a rational treatability study of polyester resin manufacturing. Relevant physical and chemical characteristics were determined. Respirometry was used for toxicity reduction evaluation after physical and chemical effluent fractionation. Of all the procedures investigated, only air stripping was significantly effective in reducing wastewater toxicity. Air stripping in pH 7 reduced toxicity in 18.2 %, while in pH 11 a toxicity reduction of 62.5 % was observed. Results indicated that toxicants responsible for the most significant fraction of the effluent's instantaneous toxic effect to unadapted activated sludge were organic compounds poorly or not volatilized in acid conditions. These results led to useful directions for conducting treatability studies which will be grounded on actual effluent properties rather than empirical or based on the rare specific data on this kind of industrial wastewater.

Keywords: Toxicity-directed approach; polyester manufacturing wastewater; biological treatment; respirometry; organic chemical industry.

1. Introduction

For many decades, industrial effluents were often discharged to publicly owned treatment works (POTWs) to be fully treated, along with sewage. However, toxicants found in industrial wastewaters may inhibit the biological activity of the treatment plant biomass, causing process upsets and making their way into the waters [1]. There is also the possibility of volatilization of the toxicants in sewers, bar racks, sedimentation tanks and aeration basins before biodegradation. Toxicants can also accumulate in the produced sludge, causing potential hazard risks for plant operators and public health, as well as sludge disposal problems [2]. In developed countries, more than thirty years ago, these practical and environmental concerns led to regulations that demanded pretreatment at the source of industrial wastewaters before discharge in POTWs [3]. Although this is a worldwide tendency nowadays, Brazilian POTWs still struggle with toxic industrial wastes and there's no consensus about a broad pretreatment program concerning hazardous wastes.

In order to determine the best practicable pretreatment technology available to eliminate or reduce the discharge of hazardous pollutants to POTWs, the concern of industries to better know and understand the nature of their effluents has grown. This led to the necessity of a broader characterization of industrial wastewaters, especially in respect to hazardous compounds and their potential toxicity. The early approach for wastewater analysis and monitoring for toxicity was on a chemical-specific basis. The chemical specific approach alone has many shortcomings, including the inability to identify synergistic effects or the bioavailability of the toxin(s). The more contemporary whole-effluent approach to toxicity involves also the use of toxicity tests to measure the toxicity of wastewaters [4].

Industrial effluents are often contaminated by a multitude of chemicals. Since often no *a priori* knowledge of relevant toxicants exists, chemical analysis alone is not an appropriate tool for treatability assessment. Instead, a linkage of effect data and hazardous compounds is required. For that purpose, the concept of toxicity-directed wastewater approach was developed, which is based on a combination of fractionation procedures, bioassays and chemical analytical methods [5]. Identification of chemical classes associated with the measured biological endpoint is frequently achievable [6]. Thus, if the goal is to obtain information for effective effluent toxicity reduction with a given treatment or pretreatment, toxicity-directed wastewater approach can be the best available option.

A protocol for Toxicity Identification Evaluation (TIE), which consists of a series of fractionation procedures followed by a bioassay that are carried out systematically to determine the sources of effluent toxicity and the potential causative toxicant(s), was proposed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) [7] for complex aquatic mixtures such as industrial effluents. Wastewater fractionation is also the first step of a protocol for Toxicity Reduction Evaluation (TRE) of effluents to POTW [8].

Since TRE tests provide information about the physical and chemical properties of the most significant toxicants in a given wastewater, this knowledge aid the evaluation of control techniques both for its treatment and pretreatment [9].

Fractionation procedures are simple techniques, requiring relatively basic reagents and equipment. If applying fractionation with the aim of selecting treatment strategies, one must keep in mind what will be feasible and cost-effective in large scale. Hazardous organic and inorganic pollutants can be removed from effluents via the following mechanisms: biodegradation, sorption, volatilization, chemical oxidation and chemical flocculation [4]. Nonpolar organic pollutants tend to adsorb to wastewater biomass. Potentially toxic metals can be removed with chelating agents, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Air stripping can remove volatile organic compounds (VOC) and ammonia. Chemical coagulation, flocculation and sedimentation can remove heavy metals and trace organics via adsorption. There are simple fractionation procedures that can achieve results similar to these mentioned pretreatment processes [10].

There are several possible bioassays that can be used in toxicity-directed analysis and the right choice is critical for assuring representativeness of results. The most widely used and studied biotests for wastewater toxicity evaluation for aerobic treatment are bioluminescence and respirometric methods, mainly because they are practical and have short-term duration. The bioluminescence method most thoroughly used is the Microtox® assay (Azur Environmental, Carlsbad, CA). The Microtox® assay is based on the naturally occurring luminescent marine bacterium *Vibrio fischeri*. The luminescence of *V. fischeri* is repressed in the presence of toxicants, and thus it responds to toxicants in a "lights-off" fashion [1]. The basis for respirometric tests is that the respiration rate of activated sludge or sludge organisms can be reduced in the presence of toxicants. The most common measure of the bacterial respiration rate is the oxygen uptake rate. Many respirometric methods are well-established and several standardized tests have existed for a long time. One example is the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) nº 209 inhibition test [11].

Using a toxicity-directed approach, this paper sets the base for a rational treatability study of polyester resin manufacturing wastewater. Specific literature on this kind of effluent is rare and mainly based on chemical-specific analysis [12]. Relevant physical and chemical characteristics were determined. Respirometry was used for toxicity reduction evaluation after physical and chemical effluent fractionation. Information about the physical and chemical properties of the most relevant toxicant(s) to biological treatment was retrieved. These results led to valuable directions for conducting treatability studies which will be grounded on actual effluent properties rather than empirical or based on the rare specific data on this kind of industrial wastewater.

2. Materials and methods

2.1. Effluent Sampling

The effluent consists of water produced by esterification reactions which differ in raw materials. This water, since formed in contact with reactants and products, is heavily contaminated and is inherent in producing the product [13]. Each polyester resin reaction is made according to commercial demand and generates respective process water. The characteristics of process waters from different resins produced can vary depending on reaction conditions and raw materials. Different reactions for same polyester resin production generate basically the same process water. In order to assure sample representativeness, a survey of year-round polyester resin production by type was made, since production is directly correlated with effluent generation. Eight different process water lines were chosen for effluent sample composition. Six of them were responsible for approximately 70 % of overall production, in slightly different proportions. Two other process water lines were selected for effluent sample composition because they were suspected to be more toxic than the average because of higher organic content (as measured by COD) and preliminary treatability results. These two water lines together were responsible for approximately 13 % of overall year production. Hence, the eight process water lines chosen were responsible for more than 80 % of total year production. None of the process waters that were left out of sample composition were responsible for more than 3.5 % of total year production. For effluent sample composition, all the process waters lines were mixed in proportion to their respective year production contribution, except for the ones supposed to be more toxic, for they were mixed in proportion to their maximum month production observed (12 and 10 %). Sample composition was made only immediately before any analysis or fractionation procedure.

2.2. Physical and chemical analysis

Unless otherwise stated, all physical and chemical analyses were made accordingly to Standard Methods [14]. Chemical oxygen demand (COD) analyses were made by the open reflux method. Since effluent contains toxic pollutants and its production occurs at high temperature (200°C), it was assumed that seeding would be necessary for effluent biochemical oxygen demand (BOD) analysis. Seeding was made through inoculation of BOD dilution water with 0.2 mL L⁻¹ of activated sludge adapted for a month to increasing concentrations of effluent up to 20 % (v/v).

The following analytical methods were used:

- Phenols - chloroform extraction method and the 4-aminoantipyrine colorimetric method;
- Nitrogen (ammonia) – distillation, titrimetric method;

- Nitrite - colorimetric method;
- Nitrogen (organic) - Macro-Kjeldahl method;
- Total phosphorus – sulfuric acid/nitric acid digestion + ascorbic acid method;
- Total reactive phosphorus – ascorbic acid colorimetric method;
- Oil and grease – Soxhlet Extraction Method;
- Solids – gravimetric method.

Conductivity was measured by an Orion conductivity meter, model 150.

Gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) was used for analysis of Volatile Organic Compounds (VOCs). Two aliquots of wastewater were separated. One of them had its pH adjusted to 3 and the other one to 11. 10 mL of sample were transferred to a 24 mL extraction vial (Chromatography Research Supplies) sealed with a silicon / PTFE septum. VOCs were extracted by solid phase micro-extraction (SPME) in vial headspace, using a 10 mm long Carboxen-PDMS coated fiber with 75 μm film thickness (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The SPME fiber was pre-conditioned at 280°C for 60 min in the GC injector. After immersion of the vial with sample in a hot bath at 30°C for 15 min, the needle of the SPME system was introduced through septum and exposed to the headspace for 45 min at 30°C, with magnetic stirring. The fiber was removed and inserted in the GC injector. VOCs were separated by gas chromatography (SHIMADZU, GC-17A) and detected by electron ionization (+70 eV) mass spectrometry (SHIMADZU, GC-MS QP-5000). Thermal desorption of VOCs from SPME fiber was made at 290°C, in splitless mode for 2 min and after that period, the valve maintained a division of 1:20. The fiber was maintained in the injector for 10 min to eliminate memory effect. A DB-1 (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) non polar silica capillary column was used for compounds separation (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Carrier gas was helium at 1.0 mL min^{-1} constant flow rate. Column temperature was held at 30°C for 5 min, then followed a temperature program from 30-80°C at 1.5°C min^{-1} and from 80-200°C at 6°C min^{-1} , being held at 200°C for 5 min. The GC-MS interface temperature was 240°C. The mass spectrometer scan mode operation was 35-350 AMU. Detector voltage was 1.2 kV.

2.3. Fractionation procedures

All the procedures conducted reflect feasible physical and chemical pretreatment options. The procedures were made immediately before biotesting or at the day before, according to required reaction time. All of them were performed at room temperature ($\approx 25^\circ\text{C}$).

- Neutralization: neutralization of approximately 200 mL of effluent was done through addition of 0.1 mol L^{-1} NaOH solution, until the pH was 7.0 ± 1.0 .
- Air stripping: air stripping was made in pH 3, 7 and 11 [7]. Approximately 200 mL of effluent were adjusted to the desired pH and left for approximately 15 hours in 500 mL Erlenmeyers with magnetic stirring. Then, air was pumped through a

porous rock for 45 minutes ($\approx 3\text{ L min}^{-1}$ rate). Before biotesting, the pH was adjusted to 7.0 ± 1.0 .

- Activated carbon adsorption and filtration: a 200 mL aliquot of effluent was left for approximately 15 hours in a 500 mL Erlenmeyer with magnetic stirring after addition of 2 g L^{-1} of powdered activated carbon (PAC). After that, the Erlenmeyer content was filtered through a GF/C glass fiber filter with $1.2\text{ }\mu\text{m}$ particle retention size (Schleicher & Schuell).
- EDTA chelating: a 200 mL aliquot of neutralized effluent was magnetically stirred for 10 minutes in a 500 mL Erlenmeyer after addition of 2.0 g L^{-1} of EDTA sodium salt. The sample was not filtered before biotesting.

2.4. *Respirometric toxicity tests*

The biologic material used was the mixed liquor of a laboratory sequencing batch reactor with 3 L of working volume. This reactor was filled with mixed liquor from an activated sludge pilot plant treating domestic sewage and maintained for four days, the time necessary for performing all the tests. At the end of each day, mixing and aeration were stopped. After decanting, half of reactor volume was discarded and the same volume of fresh media was added. Media consisted of yeast extract and peptone in concentrations of 500 and 150 mg L^{-1} , respectively. The toxicity test procedure is an adaption of the OECD nº 209 method [11]. Assays were carried out as batch tests in 500 mL glass bottles at room temperature. The pH was 7.0 ± 1.0 . The measurement of dissolved oxygen for oxygen uptake rate (OUR) calculation was made by the membrane electrode method with a YSI Model 55 Handheld Dissolved Oxygen System (Yellow Springs, Ohio), following the manufacturer instructions for calibration. Each assay had a working volume of 400 mL, being 200 mL of reactor mixed liquor and 200 mL of control or test solution. Air was pumped through a porous rock ($\approx 3\text{ L min}^{-1}$ rate) and mixing was achieved by magnetic stirring. After addition of mixed liquor and control or test solution, the vessel was aerated until dissolved oxygen was close to saturation. Then, aeration was stopped and values of dissolved oxygen were registered at one minute intervals, during the following 10 minutes. Control solution consisted of yeast extract and peptone in the same concentration of reactor feeding. Test solutions consisted of: baseline effluent; effluent after neutralization; air stripped effluent in pH 3, 7 and 11; effluent after activated carbon adsorption and filtration; and effluent after chelating agent addition. Given the OUR as the slope of dissolved oxygen concentration by time, it is possible to establish, for all the tested solutions, instantaneous inhibition effect (I) of the respiration rate occurring in the control [15]:

$$I (\%) = (1 - \text{OUR}_t / \text{OUR}_c) \times 100 \quad (1)$$

The comparison of the baseline effluent (I_b) and fractionated (I_f) solutions inhibition effects obtained with equation 1 gives the inhibition effect reduction (IR) due to physical and chemical treatment:

$$IR (\%) = (1 - I_f / I_b) \times 100 \quad (2)$$

In order to assess the magnitude of effluent inhibition, different concentrations of the baseline effluent were tested on the first experiment day. A concentration that had an inhibition effect close to 50 % was adopted for the next two test days, for baseline effluent testing and also for fractionated solutions. Tap water was used for dilution. The Volatile Suspended Solids (VSS) of each testing was not measured, but precautions were taken so that the amount of biomass was always the same when all comparisons were made. This was achieved through repeating control and baseline effluent testing immediately before each battery of fractionated solutions tests at any given day of experiment.

3. Results and discussion

3.1. Physical and chemical effluent characterization

The composite effluent was clear, lightly yellow, with no visible suspended solids or floating material. Table 1 shows the results of the effluent physical and chemical characterization analyses. Nutrients (N and P) were analyzed to assess if they would have to be added when conducting a treatability study.

Table 1. Physical and chemical effluent characterization

<i>Parameter</i>	<i>Unit</i>	<i>Result</i>
pH	-	3.0 to 3.1
TS	mg L ⁻¹	386 ± 15
VS	mg L ⁻¹	276 ± 23
FS	mg L ⁻¹	60 ± 10
TSS	mg L ⁻¹	4 ± 1
VSS	mg L ⁻¹	3 ± 1
FSS	mg L ⁻¹	1 ± 0.5
Conductivity	μS cm ⁻¹	94 ± 1
COD	mg O ₂ L ⁻¹	83,933 ± 2,050
BOD ₅	mg O ₂ L ⁻¹	13,508 ± 793
Oil & grease	mg L ⁻¹	16 ± 2
Phosphorous	mg L ⁻¹	1 ± 0.2
Reactive phosphorous	mg L ⁻¹	< 0.2
Nitrogen (ammonia)	mg NH ₃ -N L ⁻¹	4.7 ± 0.6
Nitrogen (nitrite)	μg NO ₂ ⁻ -N L ⁻¹	11 ± 1
Total Kjeldahl Nitrogen	mg N L ⁻¹	8 ± 1
Phenols	μg phenol L ⁻¹	122 ± 4

Important information is given by the results from physical and chemical characterization. The BOD₅/COD ratio is 0.16, indicating that the readily assimilable organic matter is only a small fraction of the total organic content of the effluent. The results also show a C:N:P ratio (C as BOD₅) of 100 : 0.06 : 0.007. Nutrient addition will be needed for effluent biological treatment.

However, bottom line conclusions about the sources effluent toxicity are not possible to be drawn from this physical and chemical characterization.

Phenols and their derivatives are well known organic toxicants in organic chemical industry effluents [13, 16], but they were not significantly detected by the

method used. If detected, a more elaborate phenol analysis (by chromatography) would have been done.

As expected, condensation process waters had almost no salt content (as deduced by the extremely low conductivity) and also low solids content. The high organic content is typical of organic chemical industry effluents, as seen by the high COD and BOD.

3.2. *Respirometric tests*

Table 2 shows the results of the respirometric toxicity tests of each effluent fraction.

It is recommended that the baseline effluent concentration used in toxicity tests be the one that cause 50 % inhibition (IC_{50}) in relation to the control OUR [9]. The IC_{50} in the first experiment day was between 25 and 50 % of effluent (v /v), since these tested concentrations inhibited the OUR in 31.1 and 67.5 %, respectively. The effluent concentration chosen for testing on subsequent days was 40 %, which inhibited the OUR in 63.2 % on one day and in 66.4 % on the next day. On the fourth and last day of experiment, the baseline effluent concentration was decreased to 30 % (v /v) and it inhibited the OUR in 63.7 %. These data suggest an increase in toxic effects caused by the same concentration of effluent as the days went by.

The increase in toxic effects could be explained either by a decrease or a weakening of the biomass in the laboratory reactor, after several aliquots taken for the tests. There was probably no time for all species reposition by growth in less than 24 hours between each battery of tests. However, this fact did not affect the outcome of the tests, since at the beginning of each battery of tests in each day, control and baseline effluent were tested again, and subsequent tested fractioned solutions were compared with that results, obtained at that same day. This guaranteed that the biomass present in compared tests had the same characteristics.

This approach was, in our opinion, better than using specific oxygen uptake rate (SOUR) for comparisons. SOUR is not grounded on the nature of the microbial community, but only in indirect biomass quantification (VSS), and it is well known that bioreactors are very dynamic systems [17]. Not using SOUR and VSS analyses possibly avoided the sometimes gross deviations caused by indirect biomass quantification.

Table 2. Effluent fractionation respirometric test results. OUR_t : tested solution oxygen uptake rate; OUR_c : control oxygen uptake rate; I_f : inhibition of control respiration by fraction; I_b : inhibition of control respiration by baseline effluent; IR : toxicity reduction by fractionation procedure.

<i>Fractionation</i>	<i>OUR_t</i>	<i>r²</i>	<i>OUR_c</i>	<i>I_f (%)</i>	<i>I_b (%)</i>	<i>IR (%)</i>
Neutralization	0.423	0.9991	1.114	62.0	63.7	2.7
Air stripping / pH 3,0	0.143	0.9995	0.337	57.6	66.4	13.3
Air stripping / pH 7,0	0.154	0.9979	0.337	54.3	66.4	18.2
Air stripping / pH 11,0	0.253	0.9969	0.337	24.9	66.4	62.5
PAC adsorption and filtration	0.129	0.9998	0.337	61.9	66.4	6.8
EDTA chelation	0.399	0.9995	1.114	64.2	63.7	-0.8

The effluent, being condensate water resultant of polymerization reactions, is probably easily buffered by the mixed liquor contents. This can be the reason why neutralization of baseline effluent had almost no effect for toxicity reduction.

EDTA chelation fractionation test, which can indicate the presence of toxic metals [10], had practically no toxicity reduction effect. It appears that potentially toxic metals which are present in reaction catalysts are not present in effluent in an acute toxic concentration or were already complexed. Besides the EDTA sodium salt added (2.0 g/ L), the toxic metals could also adsorb on mixed liquor biomass. However, heavy metals, even in very low wastewater concentrations, can accumulate on biomass and eventually get to a toxic concentration, causing plant upset. But this phenomenon can only be assessed in long term pilot plant studies.

Adsorption in PAC followed by filtration had little toxicity reduction. The filtration test gives an indication of whether the causative toxicant(s) is associated with solids. Thus, it appears that toxicants were not present significantly in the suspended solids. Some high log K_{ow} organic toxicants such as aromatics may be significantly involved in wastewater toxicity of industries of the same Standard Industrial Classification System (SIC) and sub categorization of polyester manufacturing industries [16]. This do not appear to be the case in the effluent tested, given the low toxicity reduction observed with PAC treatment, since aromatics are known to be removed by adsorption in activated carbon [18]. However, if these organic toxicants are present even in acute sub toxic levels, they can also accumulate in sludge, causing the same problems as heavy metal accumulation. Again, long term studies should be performed to address this kind of potential hazard.

Air stripping tests provide information about whether the effluent toxicity is caused by volatile or oxidizable compounds. Since changing of pH can change chemical characteristics of compounds, this test was carried out at ambient, acid and basic conditions [7]. The most relevant toxicity reduction was observed with this type of fractionation technique. Air stripping at pH 3 (close to the effluent's original pH) reduced toxicity in 13.3 %. There was a positive correlation between increasing values of

pH and toxicity reduction. However, this correlation was not linear. From pH 3 to 7 there was a toxicity reduction surplus of roughly 5 % and with another four pH units increase, toxicity reduction increased more than 44 %. The result observed with this last procedure was remarkable, since this fraction is related to a decrease of approximately 60 % in effluent toxicity. Thus, the toxicant(s) eliminated with air stripping in pH 11 responded for a very significant fraction of effluent instantaneous toxic effect to unadapted activated sludge.

3.3. Suppositions about identity of toxicant(s)

Suppositions were made about the identity of the effluent toxicant(s) eliminated with basic pH air stripping. Oxidizable compound hypothesis was initially discarded because the same amount of oxygen was pumped in the three air stripping tests. If oxidizable compounds were responsible for the observed toxic effects, there would probably be a more similar toxicity reduction among the air stripping tests.

Ammonia is a toxic pollutant that exhibits the physical and chemical properties that would lead to its exclusion by air stripping in basic conditions. It is commonly found and frequently removed by stripping in refinery wastewaters. While acidification fixes it in form of ammonium ion, in more basic pH it is volatilized as the gas ammonia [19]. However, the concentration of nitrogen (ammonia) found in the effluent ($4.7 \pm 0.6 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$) was very low and thus insufficient to cause the observed toxic effect [20]. The ammonia hypothesis was then discarded.

Another possibility was investigated, whether the toxicant(s) was volatilized or it was only hydrolyzed in alkaline conditions and lost its toxicity. One more respirometric assay, in exactly the same conditions previously described, was made with an effluent sample that had its pH elevated to 11 and after mixing was neutralized. The result was a toxicity reduction of less than 3 % and this hypothesis was also discarded.

The remaining and most consistent hypothesis for toxicant(s) identity was that it was a volatile organic compound which is poorly stripped in pH acid to ambient and very volatile at basic conditions. It is more likely that a group of VOCs were responsible for the toxic effect observed. In fact, GC-MS analysis showed different VOCs in pH 11 which were not detected in pH 3 (Figure 1). These are potential responsible for toxicity in the studied wastewater.

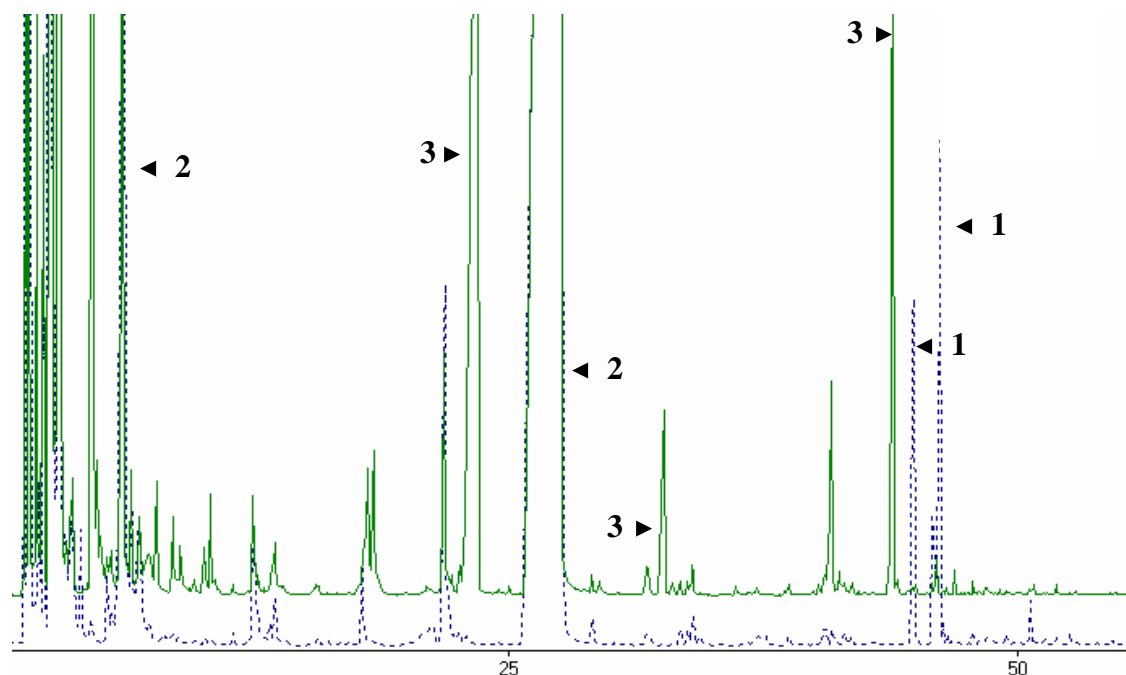


Figure 1. Superposition of wastewater headspace chromatograms in pH 3 (traced line) and in pH 11 (continued line). [1] VOCs stripped in pH 3 but not significantly stripped in pH 11; [2] VOCs stripped in both pH 3 and 11; [3] VOCs stripped only in pH 11.

3.4. Confirmation of toxic effects to acclimated biomass

Questions rose if there would be any change in the observed results if the activated sludge biomass was adapted first to the effluent, and whether the results were reproducible in different conditions. Another sample collection and effluent composition was made in the same way as already described, five months after the first results were obtained. Biomass from the same pilot plant activated sludge was again brought to laboratory and incubated in an orbital shaker for four weeks, since laboratory reactor conditions previously described favored toxics volatilization. The culture was fed only with OECD synthetic sewage [11] in the first week. Besides synthetic sewage, the culture was fed with increasing concentrations of composite effluent in subsequent weeks, up to 20 % (v/ v) at the last week, when COD removal achieved more than 90 % in 6 days. This adapted biomass was then used in respirometric assays both with the recently collected effluent (new sample) and the one used in the previous tests (former sample). The conditions were similar as already described except that control test was fed with OECD concentrated synthetic sewage in the same F/ M ratio (as COD) of the baseline effluent test, something that was not assured in the first experiments. OECD synthetic sewage was also present in test solution bottles, in concentration (as COD) similar to sewage, to meet adequate nutrient requirements of

biomass which could not be met by effluent alone. Finally, only air stripping fractionation procedures in pH 3 and 11 were tested. Baseline effluent and fractionated solutions were tested in a concentration of 40 % (v /v), which was very close to IC₅₀ for the former sample, but for the new sample, it inhibited in 66 % the observed control OUR. The results are shown in table 3.

Table 3. Effluent fractionation respirometric test results of second experiment. OUR_t: tested solution oxygen uptake rate; OUR_c: control oxygen uptake rate; I_t: inhibition of control respiration by fraction; I_b: inhibition of control respiration by baseline effluent; IR: toxicity reduction by fractionation procedure.

Fractionation	OUR_t	r²	OUR_c	I_t (%)	I_b (%)	IR (%)
Air stripping / pH 3 (former sample)	0.125	0.9983	0.237	47.3	54.3	12.9
Air stripping / pH 11 (former sample)	0.164	0.9991	0.237	30.8	54.3	43.3
Air stripping / pH 3 (new sample)	0.129	0.9989	0.237	45.6	66.0	30.9
Air stripping / pH 11 (new sample)	0.155	0.9994	0.237	34.6	66.0	47.6

Air stripping in basic pH again showed to reduce about half of the baseline effluent toxicity for both samples. Thus, toxicity reduction with this fractionation procedure could be reproduced and the VOCs stripped in basic conditions were still significantly toxic even to adapted activated sludge. There was an increase in toxicity reduction with air stripping in pH 3 in the new sample compared to the former sample. That could be explained by the maintenance of the former sample in laboratory for several months. Since the original pH of the process waters is acid, toxic compounds which are volatilized in acid pH may have already been gone from the former sample, even in tight capped containers. However, even in the new sample, stripping in basic conditions was still way more effective in toxicity reduction.

3.5. Pretreatment and treatability study directions

Organic chemicals, plastics and synthetic fibers industries wastewater treatment often requires combination of several stages of conventional as well as advanced methods of treatment, being air stripping one of the recommended technologies [16]. Pretreatment is especially important in treating organic chemical plant effluents.

Although final identification of compounds causing toxicity in the wastewater is of great interest, it is not essential for achievement of the initial objective proposed, which was to obtain information for effective effluent toxicity reduction with a given fractionation procedure. For that purpose, toxicity-directed wastewater approach was a very effective tool.

The information retrieved strongly suggests that aerobic biological treatment of strong polyester manufacturing wastewaters would be very difficult without the right pretreatment, which would be air stripping after pH adjustment to basic conditions. The design of treatability studies should be based in this information.

In treatability studies of effluents specific to esterification processes in synthetic resins industry, chemical oxidation techniques were suggested to provide partial oxidation and in this way, to enhance wastewater biological treatability [21]. Wet air oxidation was tested as pretreatment of a variety of wastewaters, including polymer manufacturing [22].

Advanced methods of oxidation combined with biological treatment with activated sludge were adopted in a treatability study of a polyester manufacturing effluent very similar to the one described in this work [12]. It was concluded that it was technically possible but inevitably costly, due to expensive chemicals requirements for chemical oxidation.

None of the above mentioned treatability studies assessed the potential toxic effects of effluent fractions to biomass. By using this toxicity-directed approach, one can avoid empiricism and the difficulty of finding specific literature on the effluent being studied. Treatability studies design can be based on relevant data retrieved from the particular wastewater that is being studied. This can be very valuable in organic chemical industry wastewater treatment, which should be addressed in a case-by-case manner [13]. Besides, the data that led to valuable pretreatment directions for the effluent studied was obtained by simple, inexpensive and rapid procedures that could be used by almost any laboratory around the world since sophisticated equipment is not required.

The volatile compounds that enter wastewater treatment plants are a potential health threat to plant operators [9]. In this particular case, they showed to be toxic even to the potential plant biomass. Many other toxicological studies should be conducted to accurately assess the risks, but the removal of toxic volatile compounds from this wastewater must be done before entrance in any kind of aerated system to prevent serious health consequences that may occur due to their volatilization.

4. Conclusions

- The toxicity-directed approach was a very effective tool for reaching the initial objectives of the study, which was to gain knowledge of feasible and efficient means for reducing effluent toxicity and make biological treatability possible.
- Air stripping in pH 11 reduced effluent toxicity in 62.5 %. The toxicant(s) related to this fractionation procedure were responsible for more than half of the observed inhibition to unadapted activated sludge. Since ammonia and alkaline hydrolysis were discarded, the toxicants were supposed to be volatile organic compounds poorly or not stripped in acid conditions.
- The toxicants stripped in pH 11 were significantly toxic even to adapted activated sludge.
- By using a toxicity-directed approach, both empiricism and the difficulty of finding specific literature on the particular kind of wastewater studied could be avoided for designing treatability studies.
- It was possible to retrieve relevant information on effluent properties by the use of procedures, tests and analyses that are simple, inexpensive and not time consuming.

5. References

- [1] S. Ren, Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments, *Environ. Int.* 30 (2004) 1151-1164.
- [2] United States Environmental Protection Agency, Fate of priority pollutants in publicly owned treatment works, Final report, v. 1-2, USEPA, Washington DC, 1982.
- [3] United States Environmental Protection Agency, EPA'S National Pretreatment Program, 1973-2003: Thirty Years of Protecting the Environment, Office of Water, USEPA, Washington DC, 2003.
- [4] G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel, Wastewater Engineering. Treatment and Reuse, fourth ed., Metcalf and Eddy, Inc. McGraw Hill, Boston, 2003.
- [5] W. Brack, Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 397-407.
- [6] L.M. Hewitt, C.H. Marvin, Analytical methods in environmental effects directed investigations of effluents, *Mut. Res.* 589 (2005) 208-232.
- [7] United States Environmental Protection Agency, Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase I, Toxicity Characterization Procedures, USEPA, Duluth, MN, 1988.
- [8] United States Environmental Protection Agency. Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants. Office of Research and Development, Risk Reduction Engineering Laboratory, Cincinnati, Ohio. 1989
- [9] G. Bitton, Wastewater Microbiology, Wiley-Liss, Inc., New York, NY, 1994.
- [10] W. S. Hall, Introduction to toxicity identification and toxicity reduction evaluations, in: D. L. Ford (Ed.), *Toxicity Reduction: Evaluation and Control*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PA, 1992, pp. 17-30.
- [11] Organization for Economic Co-operation and Development, Activated sludge, respiration inhibition test, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD Method 209, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France, 1984.
- [12] S. Meriç, I. Kabdasli, O. Tünay, D. Orhon, Treatability of strong wastewaters from polyester manufacturing industry, *Water Sci. Technol.* 39 (1999) 1-7.

- [13] P.S. Minor, Organic chemical industry's waste waters, *Environ. Sci. Technol.* 8 (1974) 620-625.
- [14] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton (Eds.), *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation, United Book Press, Inc., Baltimore, Maryland, 1998.
- [15] L. Mrafkova, D. Goi, V. Gallo, I. Colussi, Preliminary evaluation of inhibitory effects of some substances on aerobic and anaerobic treatment plant biomasses, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 17 (2003) 243-247.
- [16] United States Environmental Protection Agency, *Development Document for Effluent Limitations Guidelines and Standards for the Organic Chemicals and Plastics and Synthetic Fibers, Point Source Category, vol.I*, USEPA, Washington DC, 1987.
- [17] A. Fernández, S. Huang, S. Seston, J. Xing, R. Hickey, C. Criddle, J. Tiedje, How stable is stable? Function versus community composition, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 3697-3704.
- [18] G. J. O'Brien, Estimation of the removal of organic priority pollutants by the powdered activated carbon treatment process, *Water Environ. Res.* 64 (1992) 877-883.
- [19] W.W. Eckenfelder Jr, *Industrial Water Pollution Control*, third ed., McGraw Hill, Boston, 2000.
- [20] P. B. Dorn, Case histories – The petroleum refining industry, in: D. L. Ford (Ed.), *Toxicity Reduction: Evaluation and Control*, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, PA, 1992, pp. 183-224.
- [21] O. Tünay, S. Erden, D. Orhon, I. Kabdasli, Treatability of 2,4-D production wastewater, *Water Sci. Technol.* 30 (1994) 73-78.
- [22] D. Mantzavinos, R. Hellebrand, A.G. Livingston, I.S. Metcalfe, Reaction mechanisms and kinetics of chemical pretreatment of bioresistant organic molecules by wet air oxidation, *Water Sci. Technol.* 35 (1997) 119-127.

CAPÍTULO 2

Identification of α - β unsaturated aldehydes
as responsible for toxicity to activated sludge biomass
in a polyester manufacturing industry wastewater
using a toxicity-directed approach

Identification of α - β unsaturated aldehydes as responsible for toxicity to activated sludge biomass in a polyester manufacturing industry wastewater using a toxicity-directed approach

Abstract

Wastewaters generated in industrial production processes are often contaminated by hazardous chemicals. Characterization of industrial wastewaters by physical factors, target chemical analysis or whole effluent toxicity testing alone has many shortcomings, and the concept of toxicity-directed approach was developed for overcoming these obstacles. This approach can be very useful when specific literature is rare on a particular kind of effluent, such as the case of polyester manufacturing industry wastewater. In this study, a toxicity-directed approach was applied to a polyester manufacturing wastewater, using activated sludge respirometry as endpoint. A significant toxicity reduction was achieved by air stripping in pH 11. Headspace CG/MS analysis of wastewater in different pHs selected for a group of VOCs as responsible for the measured effect. Ten of these compounds were identified as α - β unsaturated aldehydes (acrolein congeners), on the basis of mass spectra library similarity, literature survey and Kováts index similarity with reference compounds. Confirmation of identity was made through the corroboration of the hypothesis that removal of these compounds, known to be genotoxic, would significantly reduce wastewater mutagenic potency, which was in fact observed.

Keywords: Toxicity-directed approach; polyester manufacturing industry wastewater; α - β unsaturated aldehydes; crotonaldehyde.

1. Introduction

A sustainable and cleaner industrial production has been sought by a more environmentally conscious human society. Industries are pressed by environmental standardizations, government regulations and their own public reputations. Of special interest is the treatment of wastewaters generated in industrial production processes, which are often contaminated by hazardous chemicals.

At first, characterization of industrial wastewaters with the intent of limiting their environmental impact was based primarily in physical factors such as suspended solids, color, and Biological Oxygen Demand. Then, toxic compounds of special concern were also monitored through the use of chemical-specific analyses that emphasized priority pollutants (Burkhard and Ankley, 1989). However, target analysis may completely fail to recognize the most harmful toxic wastewater constituents (Reemtsma, 2001). Besides, it does not assess the effects of interactions between contaminants.

Toxicity assessment of whole effluents using biotests is an established alternative to chemical target analysis. Interactive toxicity among wastewater components is reflected by the results. However, biotesting alone does not provide information on the compounds causing the measured effects and is therefore not a sufficient basis for risk reduction measures such as emission control (Brack, 2003).

In the early 1980s, researchers came up with a new approach called effect-, bioassay- or toxicity-directed analysis, which combines chemical analysis with physicochemical fractionation and biotesting (Brack, 2003). Thus, toxicity-directed wastewater analysis is a rational approach allowing one to focus the analytical efforts onto the most harmful constituents of an effluent (Reemtsma, 2001).

This kind of approach can be useful in situations when specific literature is rare on a particular kind of effluent, such as the case of polyester manufacturing industry wastewater (Meriç et al., 1999). This wastewater consists of water produced by esterification reactions which differ in raw materials. This water, since it is formed in contact with reactants and products, is heavily contaminated, has high COD, and is inherent in producing the product (Minor, 1974).

Since no *a priori* knowledge of relevant toxicants present in such wastewater existed, chemical analysis alone was not an appropriate tool for treatment process selection for treatability studies. Instead, a linkage of effect data and toxic constituents was required. The findings here reported were obtained during a research in which the main goal was to retrieve information for effective effluent toxicity reduction with a given fractionation procedure. Along the way, it was also possible to identify compounds associated with the measured toxicity of a polyester manufacturing wastewater to activated sludge biomass.

2. Materials and methods

2.1. Toxicity-directed approach

Respirometry toxicity tests set up on the basis of OECD Method 209 (OECD, 1984) were used as endpoint for phase I Toxicity Identification Evaluation - TIE (USEPA, 1988) after a series of physical and chemical wastewater fractionation procedures. Reduction of toxicity could be measured by comparison between the Oxygen Uptake Rate (OUR) of activated sludge biomass in contact to crude and to fractionated wastewater (Bitton, 1994). Wastewater fractionation procedures conducted reflected feasible full-scale physical and chemical pretreatment options, namely: neutralization; chelating agent (EDTA) addition; powdered activated carbon adsorption followed by filtration; air stripping in pH 3 (original wastewater pH), pH 7 and pH 11. Details about procedures used for wastewater fractionation and toxicity testing are described elsewhere (Caffaro-Filho et al., submitted). The results of this phase drove further toxicants identification steps.

2.2. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

The static headspace gas chromatographic technique can be conveniently employed for analysis of Volatile Organic Compounds (VOCs) in wastewaters produced during synthesis of polyester resins (Franchini et al., 2001). Gas chromatography / mass spectrometry (GC-MS) was used for analysis of wastewater VOCs in three different conditions: VOCs in pH 3 (original wastewater pH); VOCs in pH 11; VOCs after 9 hours of air stripping in pH 11 (air was pumped through a porous rock at 3L min⁻¹). 10 mL aliquots of each wastewater condition were separated, transferred to 24 mL extraction vials (Chromatography Research Supplies) and sealed with silicon/PTFE *septa*. VOCs were extracted by solid phase micro-extraction (SPME) in vial headspace, using a 10 mm long Carboxen-PDMS coated fiber with 75 µm film thickness (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The SPME fiber was pre-conditioned at 280°C for 60 min in the GC injector. After immersion of the vial with sample in a hot bath at 30°C for 15 min, the needle of the SPME system was introduced through *septum* and exposed to the headspace for 45 min at 30°C, with magnetic stirring. The fiber was removed and inserted in the GC injector. VOCs were separated by gas chromatography (SHIMADZU, GC-17A) and detected by electron ionization (+70 eV) mass spectrometry (SHIMADZU, GC-MS QP-5000). Thermal desorption of VOCs from SPME fiber was made at 290°C, in splitless mode for 2 min and after that period, the valve maintained a division of 1:20. The fiber was maintained in the injector for 10 min to eliminate memory effect. A DB-1 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) non-polar silica capillary column was used for compounds separation (J&W Scientific, Folsom, California, USA). Carrier gas was helium at 1.0 mL.min⁻¹ constant flow rate. Column temperature was held at 30°C for 5 min, then followed a temperature program

from 30-80°C at 1,5°C min⁻¹ and from 80-200°C at 6°C min⁻¹, being held at 200°C for 5 min. The GC-MS interface temperature was 240 °C. The mass spectrometer scan mode operation was 35-350 AMU. Detector voltage was 1.2 kV.

2.3. Compounds of interest selection

Hypothetically, compounds responsible for toxicity had to be present in wastewater in a concentration relatively high and be volatilized significantly in basic conditions, and poorly or not volatilized in acid conditions. Also, it should be completely or significantly removed by air stripping in pH 11. With this in mind, suspected compounds were selected by GC chromatograms manual alignment. To be in the compounds of interest list, a peak (considered a compound): should had an area greater than 1.000.000 area units (peaks below this threshold value were very close to chromatogram baseline); had to be detected in pH 11 chromatogram and undetected in pH 3 chromatogram, or should had an area at least 2 times higher in pH 11 chromatogram than in pH 3 chromatogram; had to be undetected in air stripped chromatogram or suffer reduction of at least 50 % in area when compared to pH 11 chromatogram.

2.4. Identification of compounds of interest

2.4.1. Mass spectra library search

The acquired mass spectra were deconvoluted by using an automated mass spectral deconvolution and identification system (AMDIS, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). All AMDIS deconvoluted mass spectra were then compared to reference spectra in the National institute of Standards and Technology mass spectral library (NIST 98) for tentative identification (Grung et al., 2007). Compounds which presented no reasonable match in mass spectral library were excluded from further investigation steps.

2.4.2. Ecotoxicological literature survey

After selecting the best hits on the NIST mass spectral database, an ecotoxicological literature survey on the tentatively identified compounds was made to assess if these compounds were recognized as presenting any relevant toxicity record and therefore to evaluate if they were capable of producing the observed toxicity to activated sludge biomass. Compounds which presented any literature recorded significant toxicity were excluded from further investigation steps.

2.4.3. Kováts retention indices databases survey

Kováts retention indices were calculated for the remaining suspected compounds. Reference alkanes were submitted to the same SPME procedure

described in 2.2. A search for Kováts retention indices of reference compounds obtained with similar capillary columns and temperature programs on existent databases was performed. The three electronic databases accessed in this study were: Flavornet (Acree and Heinrich, accessed in 2006); The Pherobase (El-Sayed, accessed in 2006); NIST Chemistry WebBook (Linstrom and Mallard, 2005). Suspected compounds with reasonable Kováts index similarity with reference compounds were considered identified.

2.4.4. *Salmonella* mutagenicity assay

The purpose of this assay was the confirmation of compounds identification. The identified compounds were known, beside their toxicity, to be also mutagenic. It was hypothesized that if they were in fact volatilized by air stripping in pH 11 but not significantly in pH 3, there should be a difference in mutagenicity between these two fractions (mutagenicity of pH 3 stripped fraction had to be higher). Two wastewater samples, after an air stripping fractionation in pH 3 and in pH 11 (as described in item 2.2), were tested in the *Salmonella*/microsome assay (Maron and Ames, 1983) after membrane filtration for the removal of microorganisms and concentrated *in situ* using the protocol developed by the Coriel Institute for Medical Research (1986). The strains used were TA100 and TA104. TA 104 is known to be very sensitive to genotoxic aldehydes (Levin et al., 1982). The experiments were performed with and without S9. The strains were kindly supplied by Dr. B. N. Ames. The S9 mix was freshly prepared before each test using lyophilized Aroclor-1254-induced rat liver S9 fraction (Moltox-Molecular Toxicology Inc., Boone, NC, USA). The doses tested were 0.1; 0.2; 0.5; 1.0 and 2.0 mL/plate. Results were analyzed with the SALANAL computer program, using the Bernstein model (Bernstein et al., 1982), and potencies were expressed in rev/L.

3. Results and discussion

3.1. Fractionated effluent testing

Results of phase I Toxicity Identification Evaluation (TIE) tests are shown in Table 1. The only kind of fractionation technique which reduced toxicity of crude wastewater significantly (more than 10 %) was air stripping. Since changing of pH can change chemical characteristics of compounds, this test was carried out at neutral, acid and basic conditions (USEPA, 1988).

Table 1. Toxicity reduction observed after each wastewater fractionation.

<i>Fractionation procedure</i>	<i>Toxicity Reduction (%)</i>
Neutralization	2.7
Air stripping / pH 3,0	13.3
Air stripping / pH 7,0	18.2
Air stripping / pH 11,0	62.5
PAC adsorption and filtration	6.8
EDTA chelation	-0.8

Air stripping at pH 3 (wastewater original pH) reduced toxicity in 13.3 %. There was a positive correlation between increasing values of pH and toxicity reduction. However, this correlation was not linear. From pH 3 to 7 there was a toxicity reduction surplus of roughly 5 % and with another four pH units increase, toxicity reduction increased more than 44 %. The result observed with this last procedure was remarkable, since this fraction is related to a decrease of approximately 60 % in effluent toxicity. Thus, toxicants eliminated with air stripping in pH 11 responded for a very significant fraction of effluent instantaneous toxic effect to unacclimated activated sludge.

The most consistent hypothesis for toxicants identity was that they were VOCs poorly or not stripped in acidic conditions and strongly volatilized in basic conditions. This hypothesis remained after discarding others such as ammonia, oxidizable and hydrolysable compounds (Caffaro-Filho et al., submitted). In order to test this hypothesis and identify toxicants, GC/MS analyses of wastewater headspace were conducted in two different pH conditions.

3.2. Compounds of interest selection

GC headspace analysis showed 161 resolved peaks in pH 3 chromatogram, 185 peaks in pH 11 chromatogram and 97 peaks in chromatogram of alkaline stripped wastewater. A total of 22 peaks (considered compounds) of pH 11 chromatogram were selected to be in the compounds of interest list (Table 2) and to be identified in further steps. Figure 1 and Figure 2 show chromatograms superposition and examples of selected compounds.

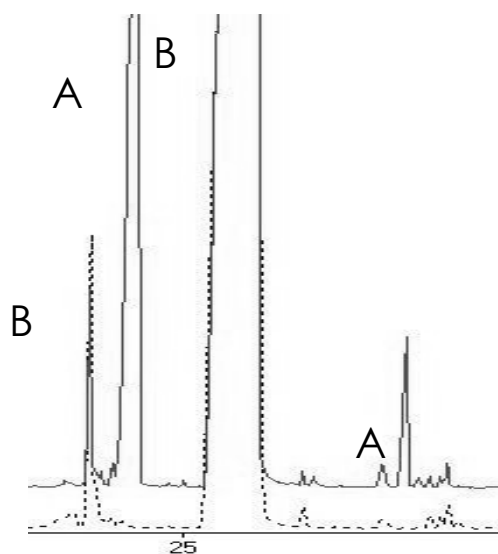


Figure 1. Superposition of pH 11 chromatogram (continued line) and pH 3 chromatogram (traced line) showing [A] compounds of interest and [B] excluded compounds.

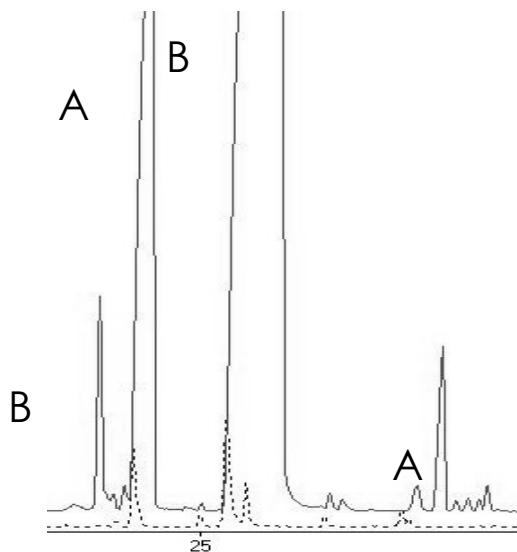


Figure 2. Superposition of pH 11 chromatogram (continued line) and stripped chromatogram (traced line) showing [A] compounds of interest and [B] excluded compounds.

3.3. Identification of compounds of interest

3.3.1. Mass spectra library search

Table 2 show mass spectra library matches for compounds of interest. Compounds are ordered by area size. Nine compounds had no reasonable match from the library used in this study, and were excluded from further investigation steps. Unfortunately, five of them were among those ones with the greatest peak areas, which in turn is a rough indication of compound concentration in sample.

The most frequently applied tool for the chemical identification within an effects-directed approach is GC/MS (Brack, 2003). However, in a review on toxicity-directed wastewater analysis, Reemtsma (2001) noted that literature does not adequately reflect the failures in identification by GC/MS, but they are likely to occur frequently.

Table 2. Compounds of interest list, showing areas and retention times in headspace GC/MS analyses and mass spectra library matches. Compounds were ordered by area size. (nf) not found in chromatogram. (-) no reasonable match in mass spectra library.

Compound	pH 11 headspace chromatogram		pH 3 headspace chromatogram		Stripped chromatogram		Library match
	area	r. time	area	r. time	area	r. time	
1	223,212,048	23,543	nf	nf	6,066,063	22,900	-
2	127,328,731	4,667	nf	nf	nf	nf	2-methyl 2-butenal [M]
3	123,207,534	2,635	nf	nf	nf	nf	2-butenal (crotonaldehyde)
4	48,802,079	43,904	nf	nf	567,822	43,754	-
5	19,636,129	32,660	nf	nf	nf	nf	-
6	13,626,734	40,850	nf	nf	nf	nf	-
7	13,297,402	18,528	nf	nf	nf	nf	-
8	12,638,453	18,094	nf	nf	nf	nf	2,4-heptadienal
9	10,290,513	7,320	nf	nf	nf	nf	Propylene glycol
10	9,772,061	1,856	474,687	1,870	1,590,666	1,865	2-methyl 2-propenal
11	7,265,271	4,712	nf	nf	nf	nf	2-methyl 2-butenal [R]
12	4,956,139	4,864	nf	nf	nf	nf	2-pentenal
13	4,889,193	7,766	nf	nf	nf	nf	2-ethyl 2-butenal
14	4,792,073	10,410	nf	nf	235,200	10,408	Bicyclo [3.1.0] hexan-3-one
15	4,295,606	8,543	nf	nf	nf	nf	2-methyl 2-pentenal
16	3,707,539	31,844	nf	nf	nf	nf	-
17	3,129,702	10,079	nf	nf	nf	nf	-
18	2,838,783	8,922	nf	nf	nf	nf	2-ethenyl 2-butenal
19	2,789,209	22,643	nf	nf	nf	nf	2-ethyl-4-methyl-1-pentanol
20	1,426,953	13,416	nf	nf	nf	nf	2,4-hexadienal
21	1,124,999	41,262	nf	nf	nf	nf	-
22	1,008,896	29,485	nf	nf	nf	nf	-

3.3.2. Ecotoxicological literature survey

Ecotoxicological literature survey on compounds 9, 14 and 19 (propylene glycol; bicycle [3.1.0] hexan-3-one; 2-ethyl-4-methyl-1-pentanol) revealed no relevant toxicity record in the context of this research. These compounds were therefore excluded from further investigations.

The remaining 10 compounds belong to the chemical class of α,β -unsaturated aldehydes (acrolein congeners). These compounds are ubiquitously occurring environmental pollutants, important industrial chemical compounds and are formed by combustion of carbon containing material (Eder and Deininger, 2002). Compounds of this group are known for aquatic toxicity (Dimitrov et al., 2004; Katritzky and Tatham, 2001), citotoxicity (Kaneko et al., 1987; Niknahad et al., 2003) and mutagenicity (Benigni et al., 2003).

Also, a survey on the pollutants generated by the Plastic Resin and Manmade Fibers made by the USEPA (1997) cites crotonaldehyde (2-butenal synonym) as a contaminant released mainly by fugitive air and point air emissions. Therefore, the remaining compounds were maintained for subsequent investigation.

3.3.3. Kováts retention indexes databases survey

Retention indexes provide valuable additional information on compounds identity (Brack, 2003). Table 3 shows the Kováts retention indexes (KI) for the remaining tentatively identified compounds, along with KIs and CAS numbers of these compounds in chemical databases. Index search was restricted to those obtained in non-polar columns with temperature ramp program.

Compounds presenting high index similarity with literature and regarded as identified were 2-butenal, 2-methyl 2-butenal [M], 2-methyl 2-butenal [R], 2-pentenal, 2-methyl 2-pentenal and 2,4-hexadienal.

Table 3. Calculated and databases Kováts Indexes (KI) for compounds which had reasonable mass spectra library matches.

Compound	Name	CAS	KI calculated	KI database	Status
2	2-methyl 2-butenal [M]	497-03-0	727	715 ^b ; 724 ^b	Identified
3	2-butenal (crotonaldehyde)	4170-30-3	631	622 ^b ; 629 ^b ; 648 ^b	Identified
8	2,4-heptadienal	4313-03-5	942	979 ^c ; 980 ^c ; 983 ^d	Tentatively identified
10	2-methyl 2-propenal	78-85-3	<600 ^a	531 ^b ; 553 ^b	Tentatively identified
11	2-methyl 2-butenal [R]	1115-11-3	728	722 ^c ; 736 ^d	Identified
12	2-pentenal	1576-87-0	733	737 ^d	Identified
13	2-ethyl 2-butenal	19780-25-7	798	nf	Tentatively identified
15	2-methyl 2-pentenal	623-36-9	813	804 ^b ; 808 ^b ; 811 ^b	Identified
18	2-ethenyl 2-butenal	20521-42-0	820	nf	Tentatively identified
20	2,4-hexadienal	142-83-6	884	878 ^b ; 881 ^b ; 883 ^b	Identified

^a Not calculated because compound retention time was inferior than first standard alkane (C6)

^b NIST Chemistry WebBook; ^c The Pherobase; ^d Flavornet (interpolated KIs)

nf – Not found

3.3.4. *Salmonella* mutagenicity assay

Results by SALANAL computer program of mutagenicity assays with wastewater after stripping of VOCs in pH 3 and after stripping of VOCs in pH 11 are shown in Table 4. Both samples exhibited a significant positive dose response. Since identified compounds were known to be mutagenic to *Salmonella* and are not removed by stripping in acidic conditions, pH 3 stripped sample should have been mutagenic and pH 11 stripped sample should have been non-mutagenic or less mutagenic than pH 3 stripped sample to confirm compounds identification.

Mutagenicity of both samples was surprisingly high. After statistical analysis of results, pH 11 stripped sample was significantly ($p < 0.1$) less mutagenic in three of the four condition tested (TA 100, TA 100+S9 and TA 104). Mutagenic potency of pH 3 stripped sample was 1.04×10^6 revertants per liter (rev/L) with strain TA 100, while with the same strain, mutagenic potency of pH 11 stripped sample was 0.88×10^6 rev/L. There was a difference of 1.5×10^5 rev/L between these two samples, although both values are still in the category of high mutagenic potential according to Houk (1992). This result was considered as another substantial evidence of toxic VOCs identity, as belonging to the class of α,β -unsaturated aldehydes.

Table 4. Mutagenic potency and 90 % confidence intervals calculated by the Bernstein model in SALANAL computer program.

Test Strains	pH 3 stripped sample		pH 11 stripped sample	
	Revertants per liter	90 % confidence interval	Revertants per liter	90 % confidence interval
TA 100	1.04×10^6	$9.61 \times 10^5 - 1.12 \times 10^6$	8.84×10^5	$8.18 \times 10^5 - 9.50 \times 10^5$
TA 100 + S9	5.24×10^5	$4.80 \times 10^5 - 5.68 \times 10^5$	4.07×10^5	$3.53 \times 10^5 - 4.61 \times 10^5$
TA 104	2.67×10^6	$2.56 \times 10^6 - 2.78 \times 10^6$	2.36×10^6	$2.19 \times 10^6 - 2.53 \times 10^6$
TA 104 + S9	1.42×10^6	$1.20 \times 10^6 - 1.64 \times 10^6$	1.27×10^6	$1.08 \times 10^6 - 1.45 \times 10^6$

2.5. Final considerations

Mutagenicity reduction by the removal of compounds of interest is a strong evidence towards the confirmation of compounds identification as a group of α,β -unsaturated aldehydes. Results obtained with strain TA 104 were more than twice higher than those obtained with TA 100. This fact also supports identification, since TA 104 very sensitive to genotoxic aldehydes (Levin et al., 1982). Also, It is known that α,β -unsaturated aldehydes are direct-acting mutagenic agents, and S9 addition reduces their mutagenic activity by providing nonspecific targets (Eder and Deininger, 2001). That characteristic was observed in the results obtained and thus is another

corroboration sustaining the identification. It also brings to light that the remaining high mutagenicity after removal of the identified α,β -unsaturated aldehydes is probably caused by related compounds which are not volatilized at room temperature ($\approx 25^\circ\text{C}$).

Crotonaldehyde (2-butenal) and the closely related 2-methyl 2-butenal showed peaks with areas greater than all the other identified α,β -unsaturated aldehydes (Table 2) and thus are present in greater concentrations than the other α,β -unsaturated aldehydes in the effluent. Crotonaldehyde has been studied by many authors and specific information on this compound is available on the ecotoxicological literature. Therefore, it was used as a representative of the overall toxicity caused by the identified α,β -unsaturated aldehydes for the following considerations.

The decrease of mutagenicity by the removal of compounds of interest in the case of TA 100 was of 1.57×10^5 rev/L. Crotonaldehyde ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}$) has a mutagenic potency of 1.95×10^3 rev/ μmol in *Salmonella* TA 100 (Benigni et al., 2003). Therefore, the observed decrease in mutagenicity would have been caused by the removal of an initial concentration of 5.64 mg of crotonaldehyde per liter.

The experimental acute toxicity (14 day LC_{50}) of crotonaldehyde to the guppy (*Poecilia reticulata*) was determined to be 7.94 $\mu\text{mol/L}$, which is equivalent to 556 $\mu\text{g/L}$ (Deneer et al., 1988). It is reasonable that a concentration ten times higher (5.64 mg/L), estimated to be the concentration of crotonaldehyde equivalent removed by air stripping in pH 11, could cause the observed acute toxicity of wastewater to unacclimated activated sludge.

In a comprehensive review on the genotoxicity of industrial wastes and effluents, Houk (1992) classified *Salmonella* mutagenic potencies of whole effluents from low ($<10^3$ rev/L) to extreme ($>10^7$ rev/L), based mainly on results with TA 100 strain. All but four of effluents reviewed fell below the 10^6 rev/L range. In the category of plastics, resins and rubber manufacturers, extreme genotoxicity was related with wastes like plastic tar, which required metabolic activation (S9 addition) to generate metabolites that were more potent than the parent constituents. In contrast, the wastewaters obtained in the production of plastics and resins surveyed were variable in their response, and those that were genotoxic were not particularly potent relative to other industrial wastewaters.

In the case of the studied wastewater, the mutagenic potency found (10^6 rev/L) is higher than the majority of effluents reviewed by Houk (1992). Also, the genotoxicity was neither dependent on S9 activation nor related with the solid wastes, but rather, with the liquid wastewater. The most significant source of mutagenicity of this polyester manufacturing wastewater remains unknown, therefore it should be object of further research.

The concept of bioassay- or toxicity-directed approach is not new. However, questions whether this kind of approach is a powerful tool, or costly and time consuming with little chance of success, have been raised (Brack, 2003). The identification of chemicals with toxicity or mutagenic activity in real-world matrices has proven to be a

difficult challenge, and many of the studies have been labeled as ending with "disappointment" (Reemtsma, 2000).

As Hewitt and Marvin (2005) stated, It is a fact that "each effects-directed investigation is a hypothesis-driven research project for which several uncertainties must be addressed during the course of the study. It cannot be emphasized enough that such endeavors are not trivial and require significant resources including infrastructure, personnel and a multidisciplinary team of trained individuals". They proposed a more realistic definition of successful investigations "as those, which are able to provide more information as to the nature and cause of the effect than before the investigation began. In this way, nearly all effects-directed studies provide some measure of success, as in for example, the elimination of suspected compounds as causative agents and the identification of compound classes involved in the responses".

It is clear that some of the sources of toxicity of this polyester manufacturing industry wastewater remain unknown, but much has been revealed through the efforts of the present study. In this way, the toxicity-directed approach used has proven to be "a powerful tool" and the outcome was not "disappointment", but rather, "useful information on the source and nature of the effect so that remediation efforts can be undertaken" (Hewitt and Marvin, 2005).

4. Conclusions

- A group of VOCs stripped in pH 11 were responsible for the most significant source of toxicity to unacclimated activated sludge biomass in a polyester manufacturing industry wastewater. GC/MS analysis of wastewater headspace in different pH conditions selected for 22 compounds as source of toxicity. Ten of them were identified as belonging to the group of α,β -unsaturated aldehydes.
- VOCs identification was confirmed through results of a *Salmonella* mutagenicity assay. α,β -Unsaturated aldehydes are known to be genotoxic. Wastewater mutagenic potency decreased significantly ($p < 0.1$) after removal of toxic VOCs.
- The toxicity-directed approach, used in this study, was a valuable tool for retrieving useful information on the source of toxicity of polyester resin manufacturing wastewater, for which specific literature is rare.

5. References

- Acree, T. E. and Heinrich, A. Flavornet and human odor space, Gas Chromatography - Olfactometry (GC-O) of natural products. <http://flavornet.org/flavornet.html>. Accessed in August, 5th 2006.
- Benigni, R., Passerini, I. and Rodomonte, A. (2003) Structure-activity relationships for the mutagenicity and carcinogenicity of simple and α - β unsaturated aldehydes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42, 136-143.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M. C. (1982) An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutation Research* 97, 267-281.
- Bitton, G. (1994) *Wastewater Microbiology*. 478 p. Wiley-Liss, Inc., New York, NY.
- Brack, W. (2003) Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(x), 397-407.
- Burkhard, L. P. and Ankley, G. T. (1989) Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. *Environmental Science & Technology* 23(12), 1438-1443.
- Caffaro-Filho, R. A., Morita, D. M., Wagner, R. and Durrant, L. R. Toxicity-directed approach of polyester manufacturing industry wastewater provides useful information for conducting treatability studies. *Journal of Hazardous Materials*. Submitted.
- Coriel Institute for Medical Research (1986) Ames Salmonella mutagenicity assay protocol. Camden, NJ: Department of Microbiology, CIMR. 13 p.
- Deneer, J. W., Seinen, W and Hermens, J. L. M. (1988) The acute toxicity of aldehydes to the guppy. *Aquatic Toxicology* 12, 185-192.
- Dimitrov, S., Koleva, Y., Schultz, W., Walker, J. D. and Mekenyan, O. (2004) Interspecies quantitative structure-activity relationship model for aldehydes: aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(2), 463-470.
- Eder, E. and Deininger, C. (2001) Mutagenicity of 2-alkylpropenals in *Salmonella typhimurium* Strain TA 100: structural influences. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37, 324-328.

- Eder, E. and Deininger, C. (2002) The influence of the solvents DMSO and ethanol on the genotoxicity of α,β -unsaturated aldehydes in the SOS chromotest. *Mutation Research* 516, 81-89.
- El-Sayed, A. M. The Pherobase. www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php. Accessed in October, 8th 2006.
- Franchini, M., Marton, D. and Tapparo, A. (2001) Headspace gas chromatographic determination of 2-alkyl-5,5-dimethyl-1,3-dioxane derivatives in wastewaters of a polyester resin plant. *The Analyst* 126, 469-471.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K., Langford, K. and Thomas, K. V. (2007) Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere* 67, 108-120.
- Hewitt, L. M. and Marvin, C. H. (2005) Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutation Research* 589, 208-232.
- Houk, V. S. (1992) The genotoxicity of industrial wastes and effluents – A review. *Mutation Research* 277, 91-138.
- Kaneko, T., Shuji, H., Nakano, S. and Matsuo, M. (1987) Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. *Chemico-Biological Interactions* 63, 127-137.
- Katritzky, A. R. and Tatham, D. B. (2001) Theoretical descriptors for the correlation of aquatic toxicity of environmental pollutants by quantitative structure-toxicity relationships. *Journal Chemical Information and Computer Sciences* 41, 1162-1176.
- Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. and Ames, B. N. (1982) A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A.T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(23), 7445-7449.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113, 173-215.
- Meriç, S., Kabdasli, I., Tünay, O. and Orhon, D. (1999) Treatability of strong wastewaters from polyester manufacturing industry. *Water Science & Technology* 39(10-11), 1-7.

- Minor, P. S. (1974) Organic chemical industry's waste waters. *Environmental Science & Technology* 8, 620-625.
- Niknahad, H., Siraki, A. G., Shuhendler, A., Khan, S., Teng, S., Galati, G., Easson, E., Poon, R. and O'Brien, P. J. (2003) Modulating carbonyl cytotoxicity in intact rat hepatocytes by inhibiting carbonyl-metabolizing enzymes. I. Aliphatic alkenals. *Chemico-Biological Interactions* 143-144, 107-117.
- NIST Mass Spectra Data Center. Retention indices. In: NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P. J. Linstrom and W. G. Mallard, June 2005, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. <http://webbook.nist.gov>.
- Organization for Economic Co-operation and Development – OECD (1984) Activated sludge, respiration inhibition test, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD Method 209, OECD, Paris, France.
- Reemtsma, T. (2001) Prospects of toxicity-directed wastewater analysis. *Analytica Chimica Acta* 426, 279-287.
- United States Environmental Protection Agency – USEPA (1988) Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase I, Toxicity Characterization Procedures, USEPA, Duluth, MN.
- United States Environmental Protection Agency – USEPA (1997) EPA Office of Compliance Sector Notebook Project: Profile of the plastic resin and manmade fiber industries, USEPA, Washington, DC.

ANEXO I

Cromatogramas comparados das análises de *headspace* do efluente
em pH 11 e pH 3

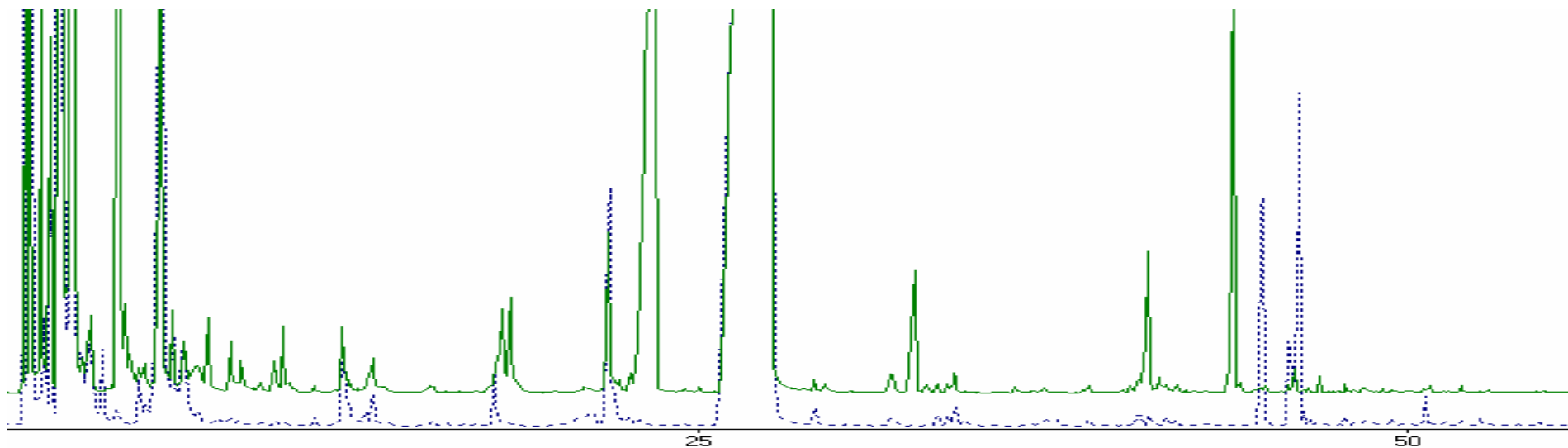


Figura 3. Comparação de cromatogramas: headspace em pH 11 (linha contínua) e headspace em pH 3 (linha tracejada).

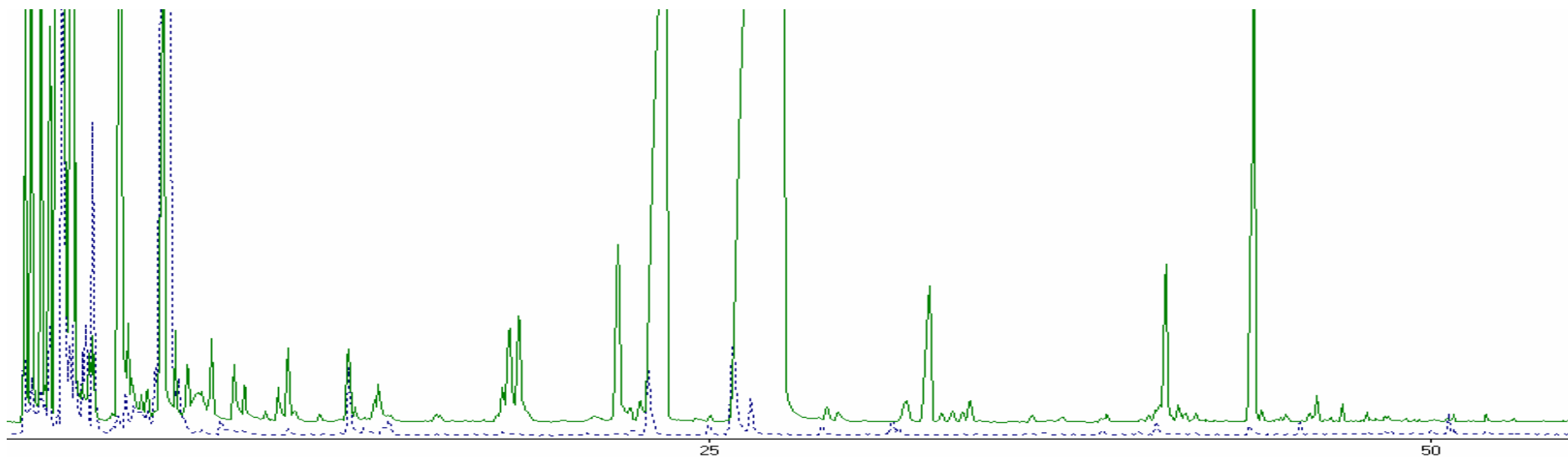


Figura 4. Comparação de cromatogramas: headspace em pH 11 (linha contínua) e headspace após 9 horas de arraste com ar em pH 11 (linha tracejada).

ANEXO II

Comparação dos espectros de massas dos compostos de interesse
com os padrões da biblioteca de espectros NIST

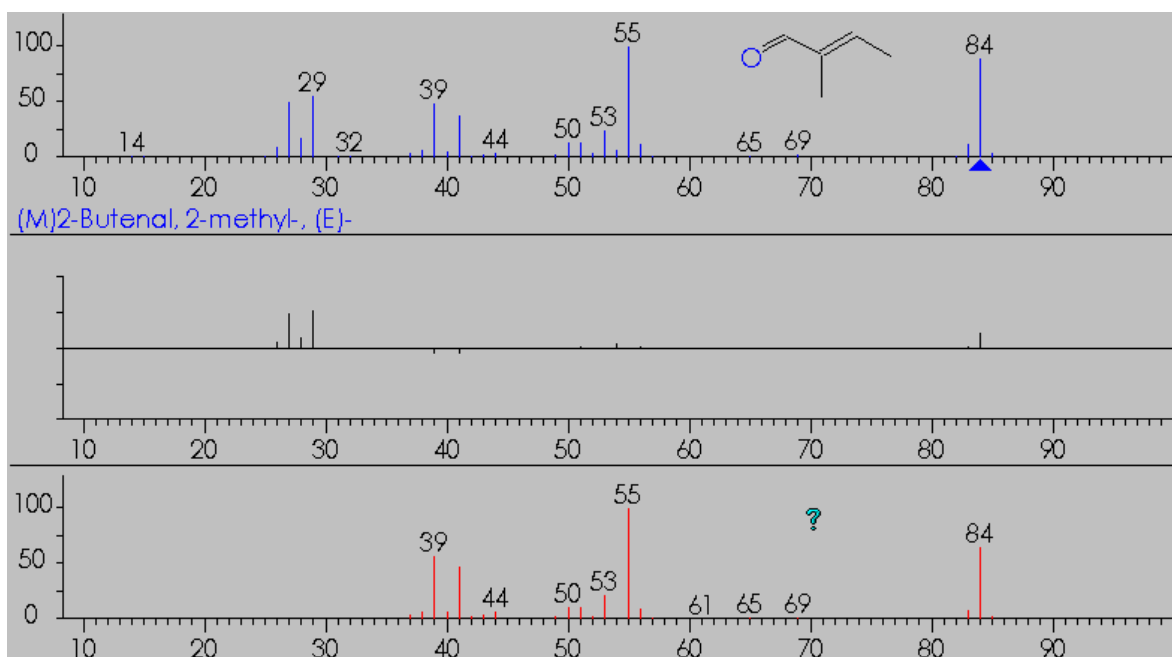


Figura 5. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-butenal [M] (no alto) e do COV #2, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

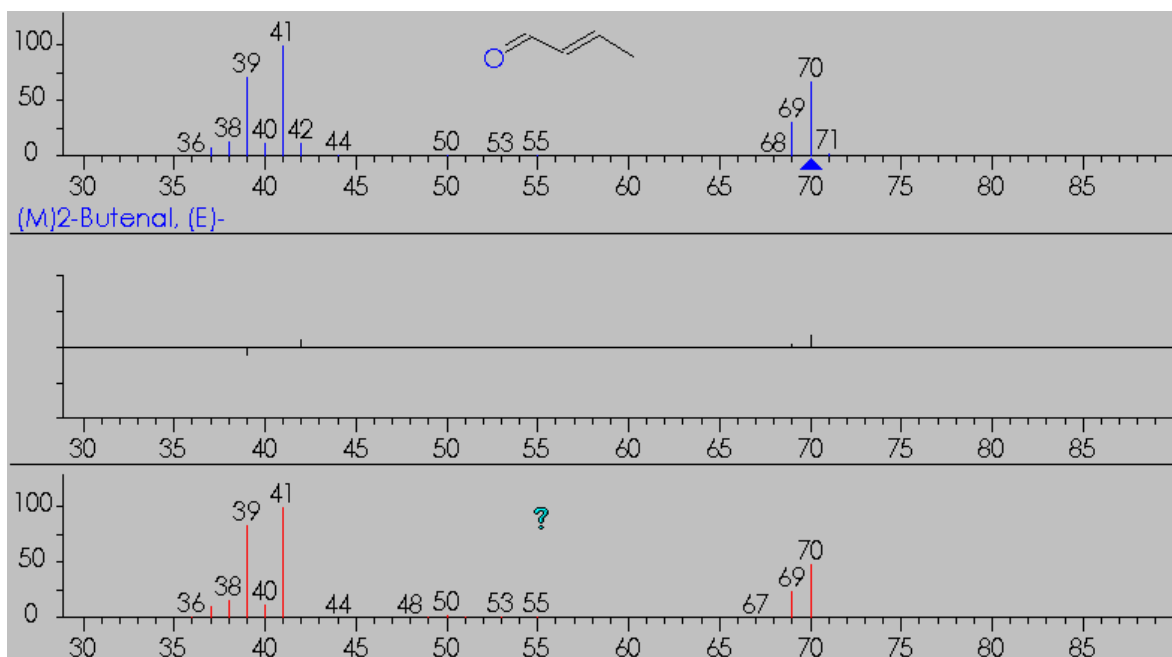


Figura 6. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-butenal (no alto) e do COV #3, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

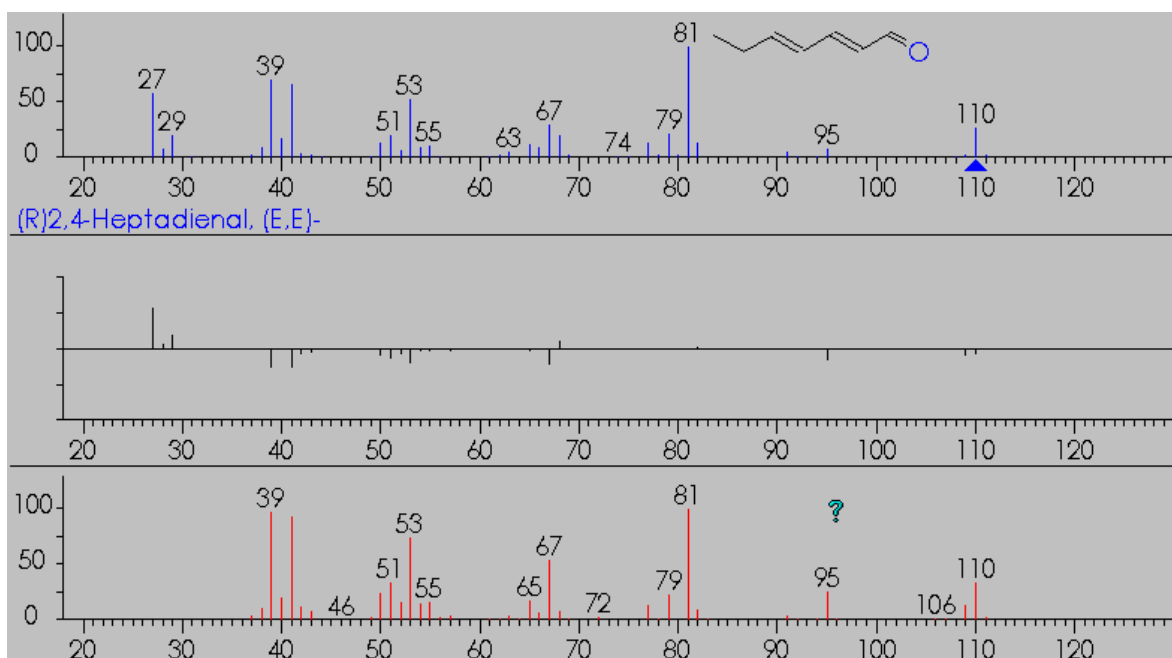


Figura 7. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2,4-heptadienal (no alto) e do COV #8, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

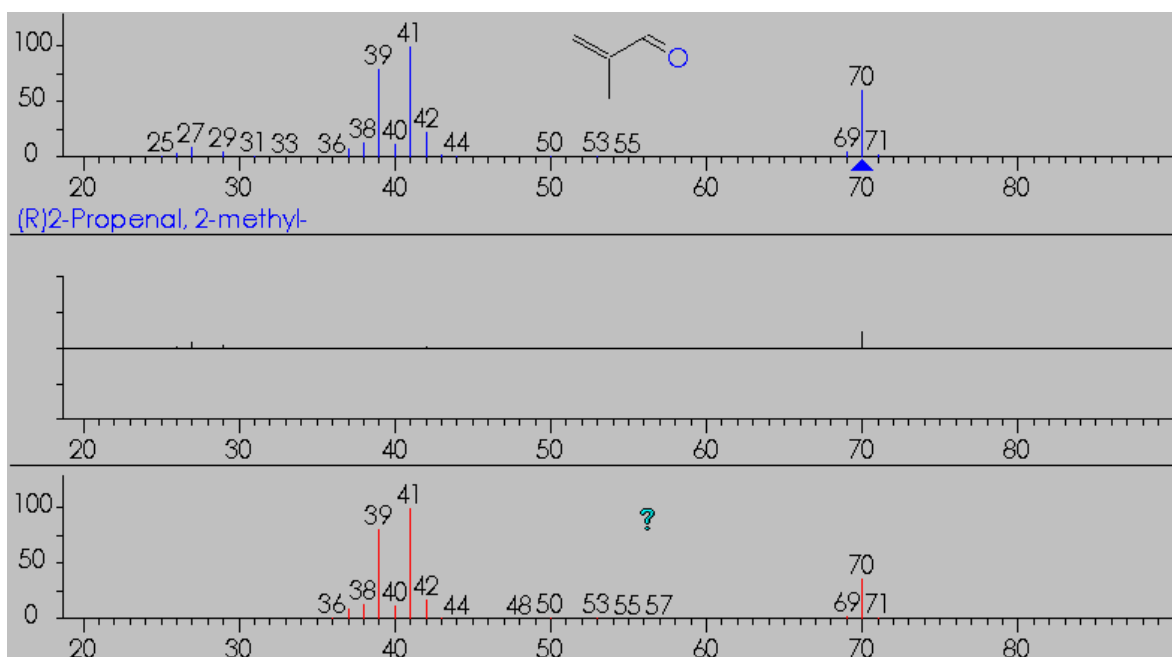


Figura 8. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-propenal (no alto) e do COV #10, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

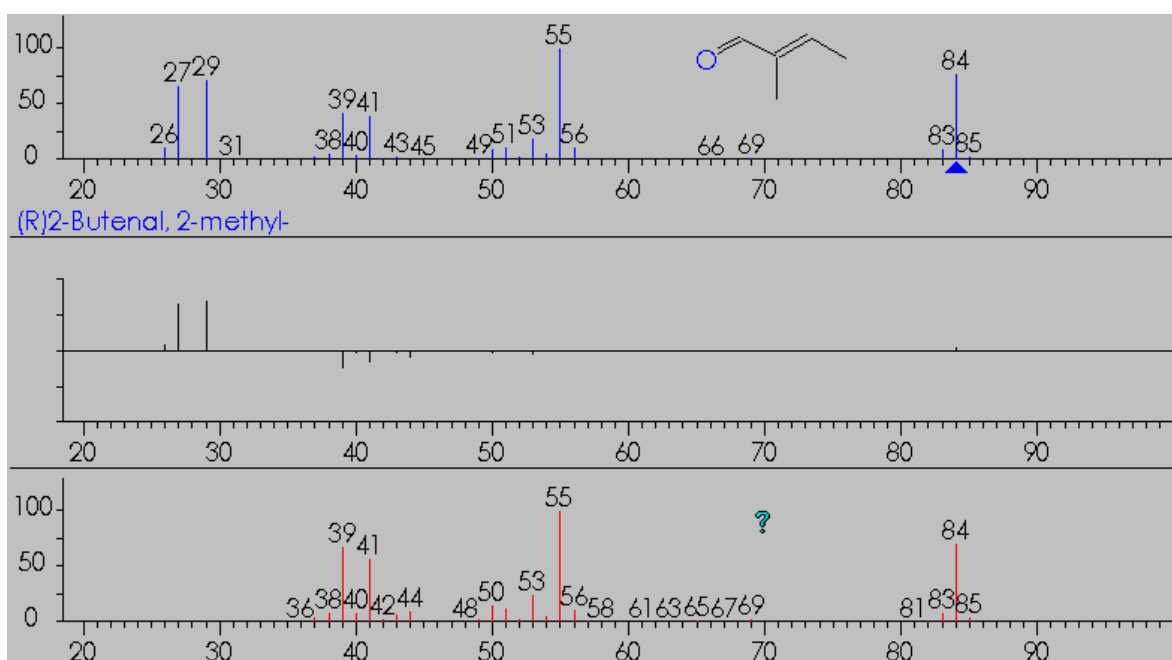


Figura 9. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-butenal [R] (no alto) e do COV #11, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

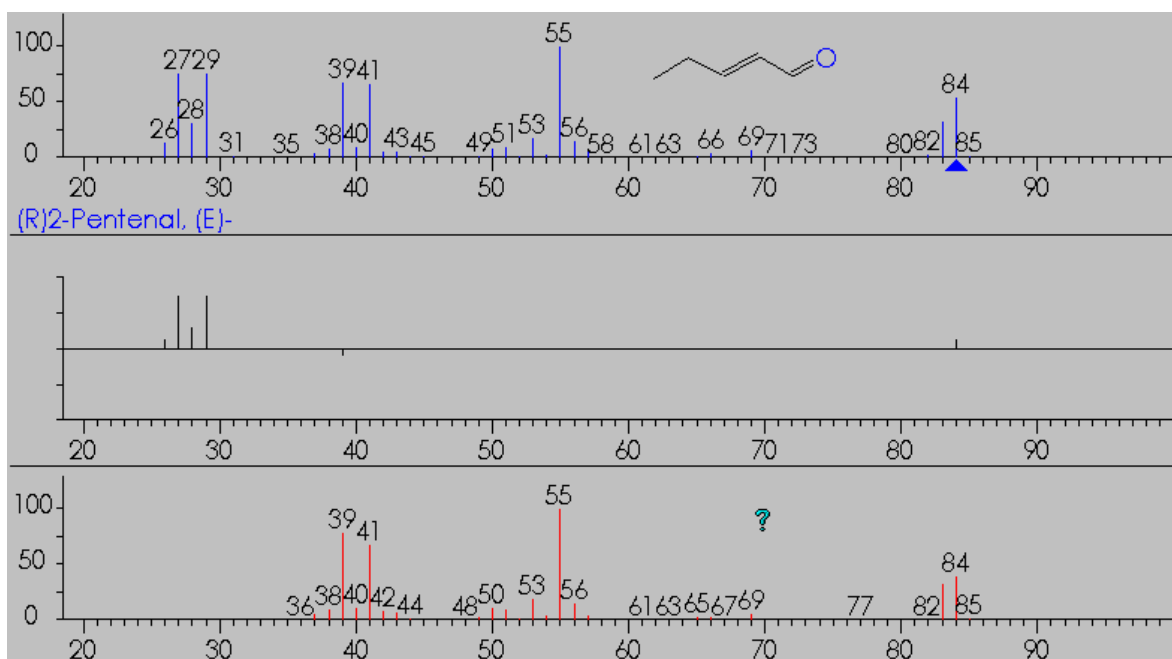


Figura 10. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-pentenal (no alto) e do COV #12, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

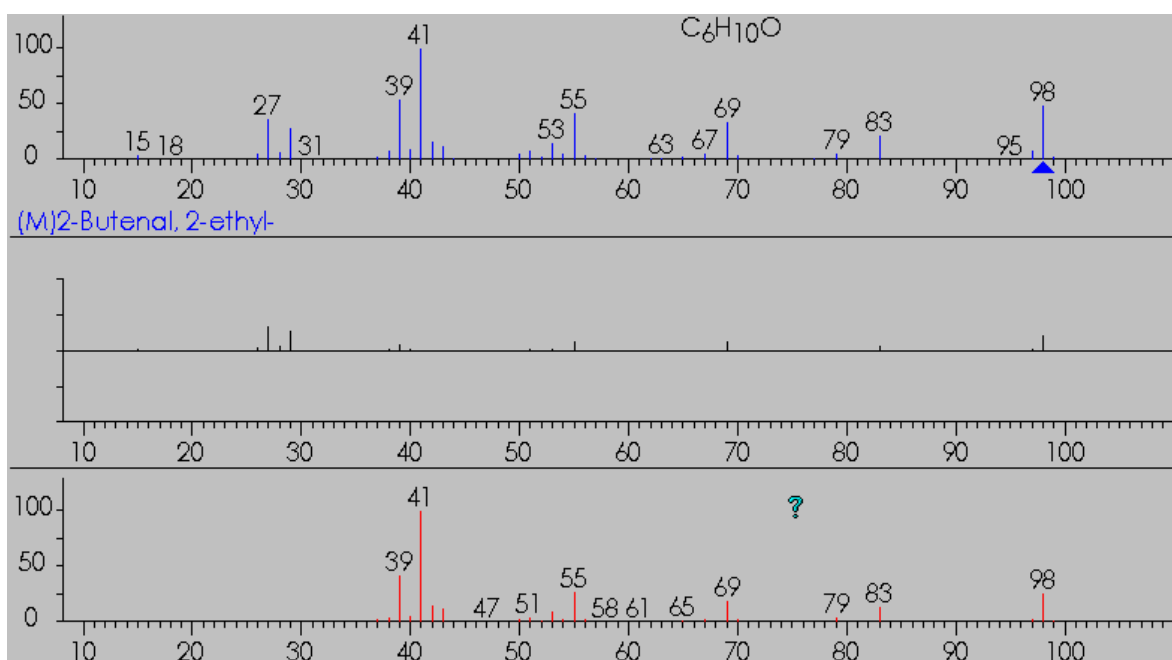


Figura 11. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-etil 2-butenal (no alto) e do COV #13, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

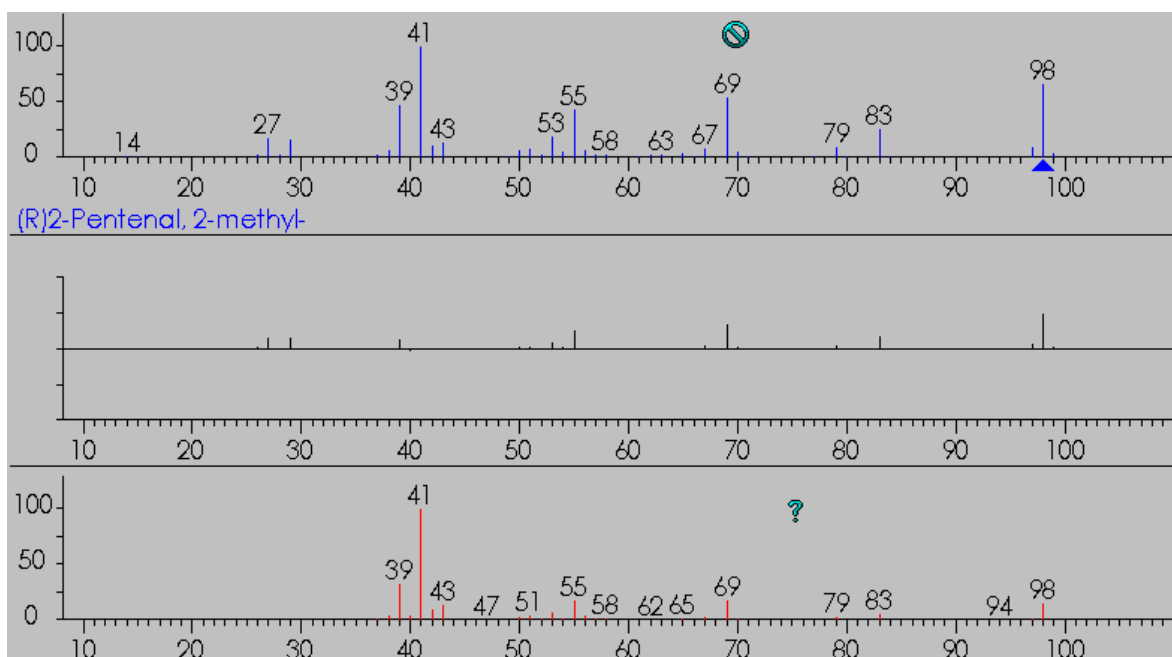


Figura 12. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-metil 2-pentenal (no alto) e do COV #15, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

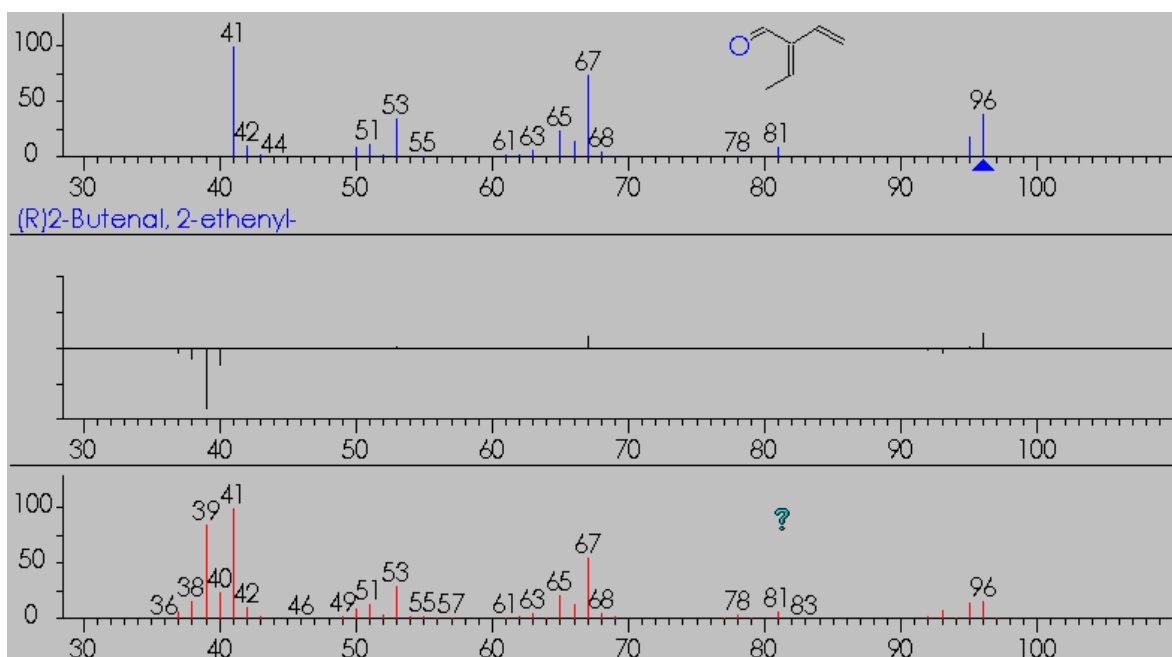


Figura 13. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2-etenil 2-butenal (no alto) e do COV #18, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

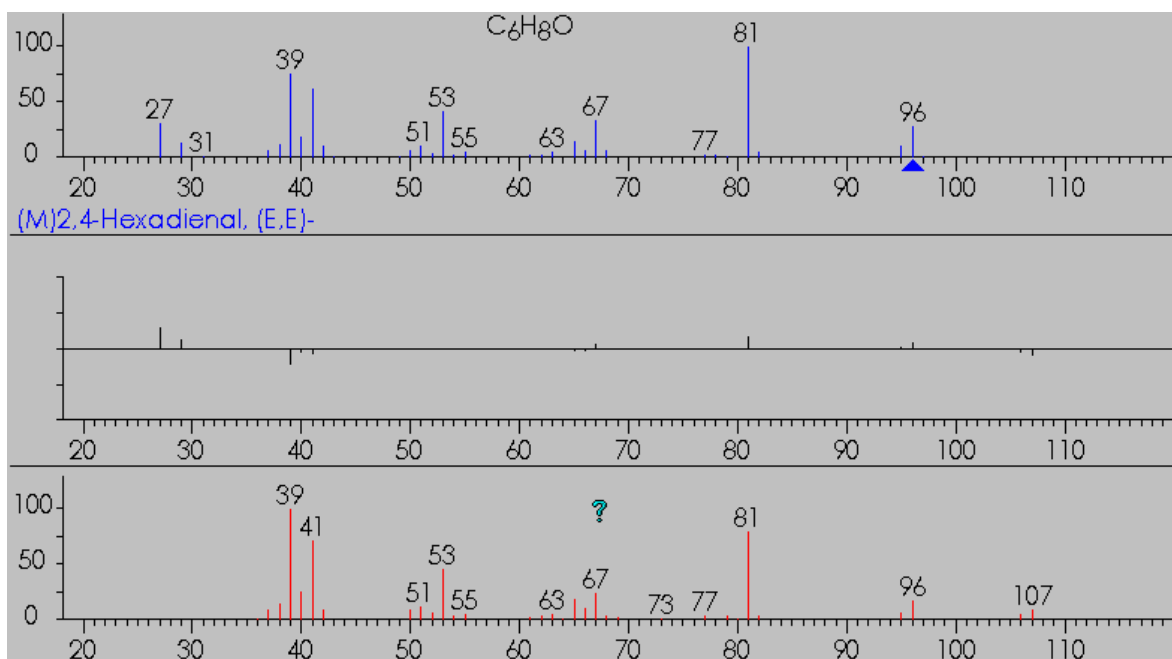


Figura 14. Comparação dos espectros de massas do padrão de 2,4-hexadienal (no alto) e do COV #20, presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

ANEXO III

Resultados da análise estatística baseada no modelo de Bernstein
feita com o programa computacional SALANAL

SALANAL: Record 1

Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1961
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37°C]
 Strain: TA100

Metabolic activation: None

Data File Name: C:\SALANAL\1961A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein	
	0.00	120	97	104	92	106	103.80	10.64	104.68
	0.10	228	204	211			214.33	12.34**	208.88
	0.50	625	604	632			620.33	14.57**	625.70
	1.00	647	667	778			697.33	70.57**	
	2.00	492	438	485			471.67	29.37**	
p	0.50	2100p	2140p						

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.947.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 1042.034755 .

Standard error of the slope is = 45.064412 .

90% confidence limits for the slope are <961.713700, 1122.355811>.

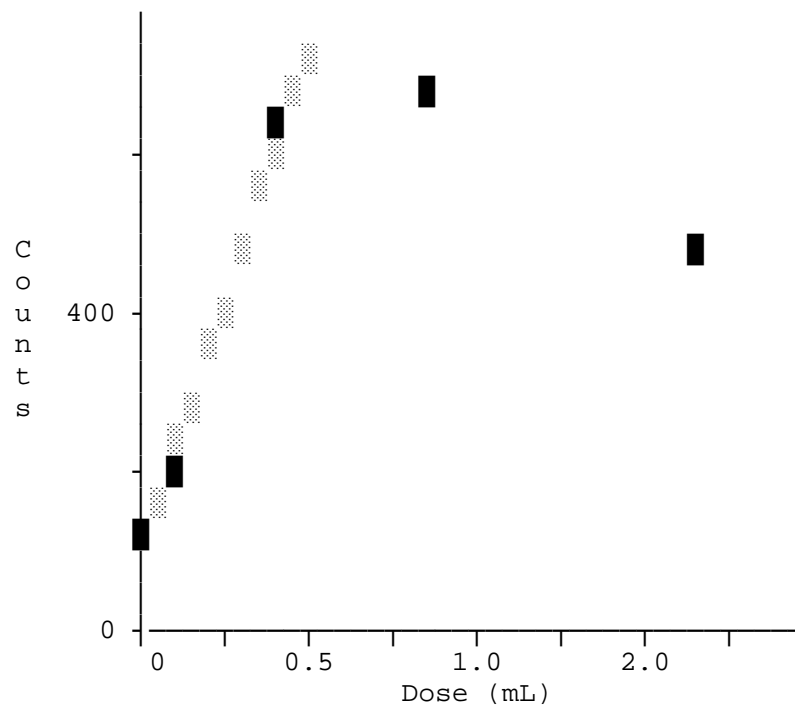
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: Record 1

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1961
Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
Tester Strain: TA100



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 2

Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1962
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37°C]
 Strain: TA100

Metabolic activation: None

Data File Name: C:\SALANAL\1962A

Code	Dose	--	counts		--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	120	97	104	92	106	103.80	10.64	103.04
	0.10	178	185	200			187.67	11.24**	191.52
	0.50	543	521	584			549.33	31.97**	545.47
	1.00	566	610	661			612.33	47.54**	
	2.00	395	385	377			385.67	9.02**	
p	0.50	2100p	2140p						

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.962.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 884.861990 .

Standard error of the slope is = 37.040602 .

90% confidence limits for the slope are <818.842262, 950.881718>.

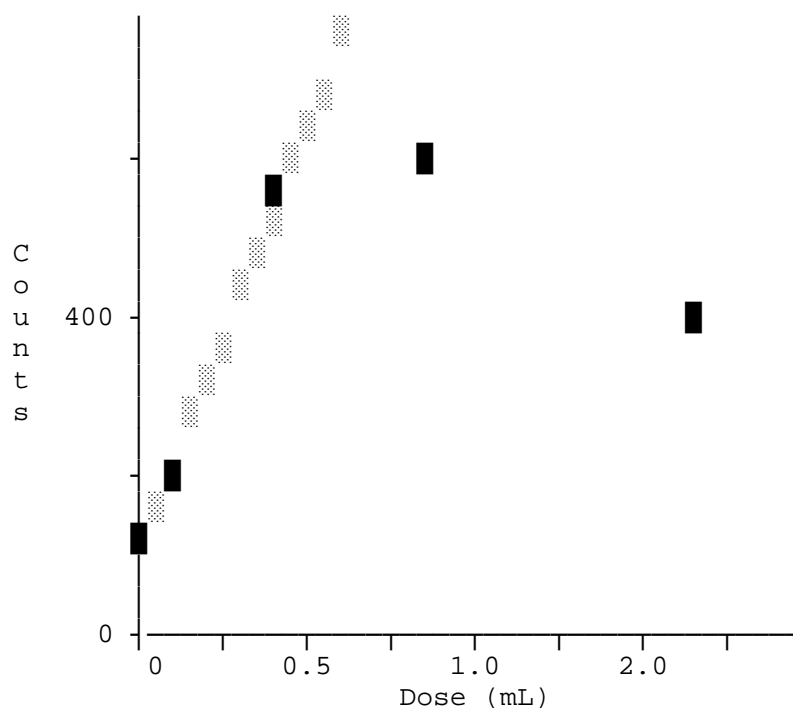
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: record 2

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1962
Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
Tester Strain: TA100



■ = Observed; ▨ = Predicted.

The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 3

Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1961
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA100+S9

Metabolic activation species..... R
 organ L
 inducer A
 S9 concentration ... 0.50

Data File Name: C:\SALANAL\1961A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein	
	0.00	107	97	114	111	102	106.20	6.83	104.18
	0.10	133	146	155			144.67	11.06*	156.60
	0.20	205	223	239			222.33	17.01**	209.03
	0.50	353	373	368			364.67	10.41**	366.30
	1.00	504	538	589			543.67	42.78**	
	2.00	395	381	441			405.67	31.39**	
p	2.50	2270p	2270p						

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.278.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 4 doses

Estimate of the slope is = 524.234213 .

Standard error of the slope is = 25.096783 .

90% confidence limits for the slope are <480.025861, 568.442564>.

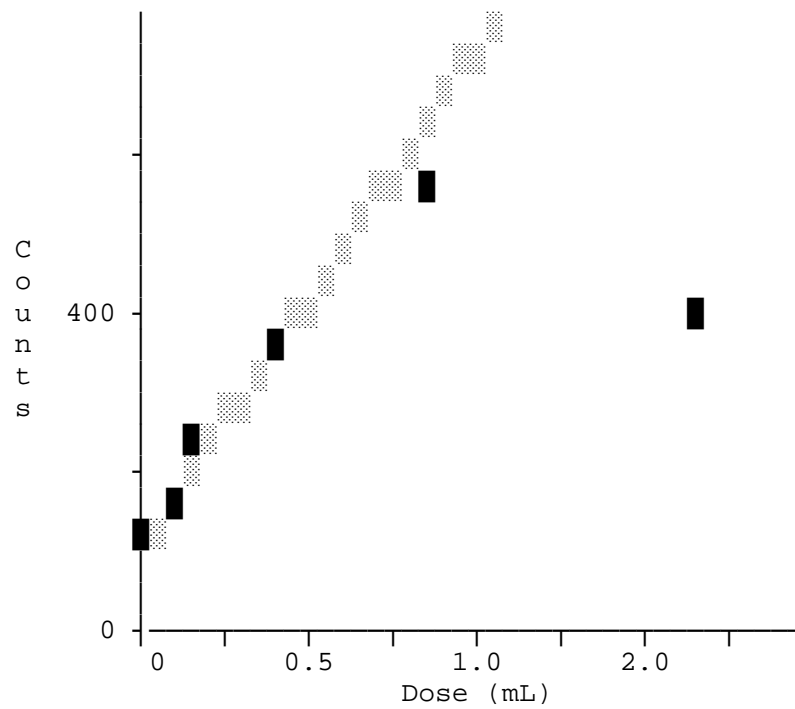
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: record 3

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1961
Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
Tester Strain: TA100+S9



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 4

Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1962
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA100+S9

Metabolic activation species..... R
 organ L
 inducer A
 S9 concentration ... 0.50

Data File Name: C:\SALANAL\1962A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein	
	0.00	107	97	114	111	102	106.20	6.83	104.57
	0.10	140	145	127			137.33	9.29*	145.31
	0.20	205	198	175			192.67	15.70**	186.04
	0.50	356	356	359			357.00	1.73**	
	1.00	495	536	513			514.67	20.55**	
	2.00	359	355	348			354.00	5.57**	
p	2.50	2270p	2270p						

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.372.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 407.341427 .

Standard error of the slope is = 30.739624 .

90% confidence limits for the slope are <353.193128, 461.489727>.

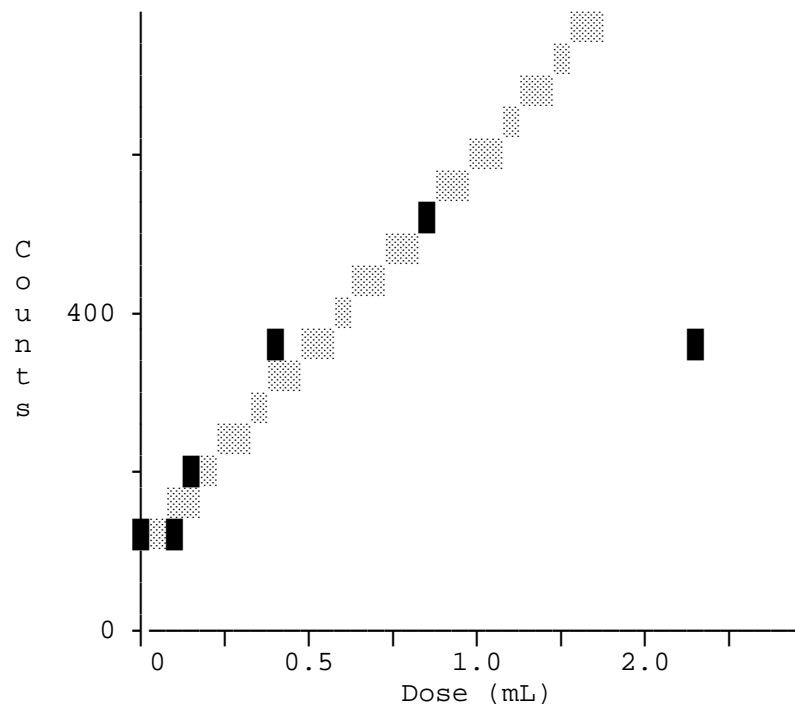
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: Record 4

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1962
Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
Tester Strain: TA100+S9



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 5

Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1961
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA104

Metabolic activation: None

Data File Name: C:\SALANAL\1961A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	265	272	282	257 294	274.00	14.47	275.40
	0.10	563	557	550		556.67	6.51**	543.17
	0.20	820	795	783		799.33	18.88**	810.94
	0.50	928	927	877		910.67	29.16**	
	1.00	955	949	988		964.00	21.00**	
	2.00	843	841	855		846.33	7.57**	
p	0.50	1310p	1320p					

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.619.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 2677.729745 .

Standard error of the slope is = 61.977855 .

90% confidence limits for the slope are <2568.554842, 2786.904648>.

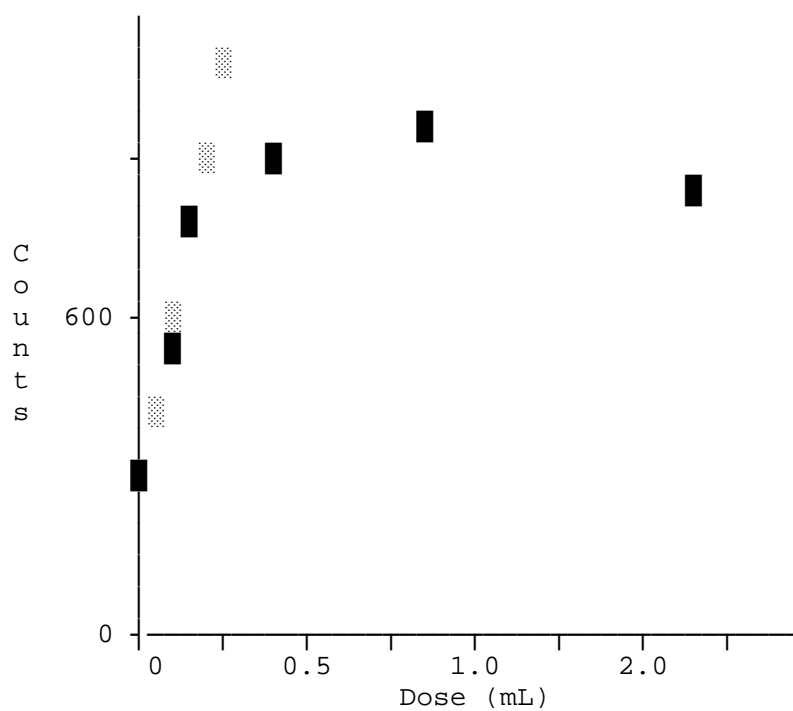
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: record 5

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1961
Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
Tester Strain: TA104



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 6

Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1962
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA104

Metabolic activation: None

Data File Name: C:\SALANAL\1962A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	265	272	282	257 294	274.00	14.47	276.06
	0.10	520	512	560		530.67	25.72**	512.20
	0.20	704	760	736		733.33	28.10**	748.34
	0.50	834	948	895		892.33	57.05**	
	1.00	879	857	960		898.67	54.24**	
	2.00	703	720	690		704.33	15.04**	
p	0.50	1310p	1320p					

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.737.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 2361.401197 .

Standard error of the slope is = 97.198964 .

90% confidence limits for the slope are <2190.183794, 2532.618601>.

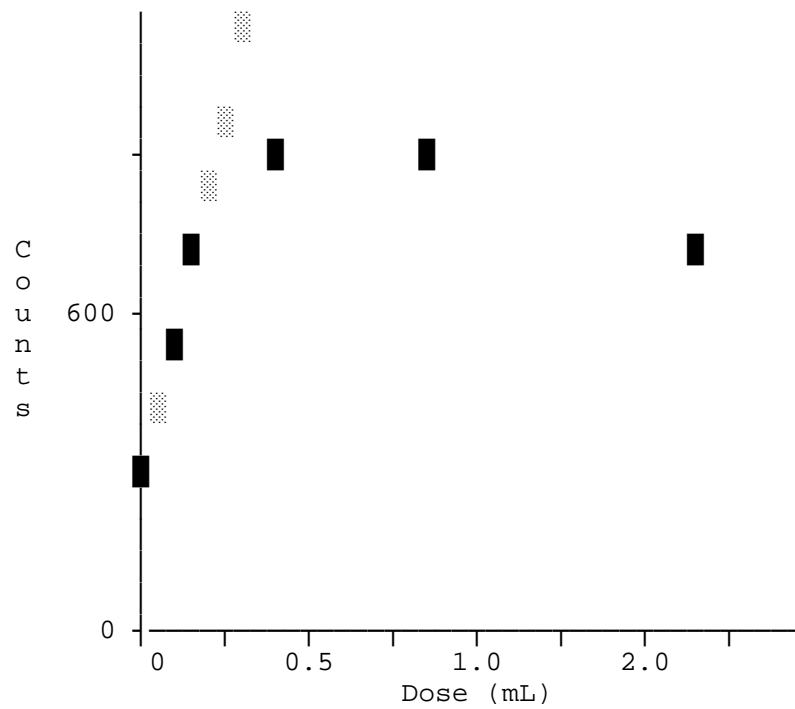
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: Record 6

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1962
Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
Tester Strain: TA104



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 7

Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1961
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA104+S9

Metabolic activation species..... R
 organ L
 inducer A
 S9 concentration ... 0.50

Data File Name: C:\SALANAL\1961A

Code	Dose	--	counts	--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	384	388	392	377 302	368.60	37.64	370.80
	0.10	530	546	501		525.67	22.81**	513.17
	0.20	645	636	660		647.00	12.12**	655.53
	0.50	810	771	758		779.67	27.06**	
	1.00	855	837	912		868.00	39.15**	
	2.00	843	849	964		885.33	68.19**	
p	2.50	850p	860p					

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.967.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 1423.659641 .

Standard error of the slope is = 126.289680 .

90% confidence limits for the slope are <1201.198513, 1646.120769>.

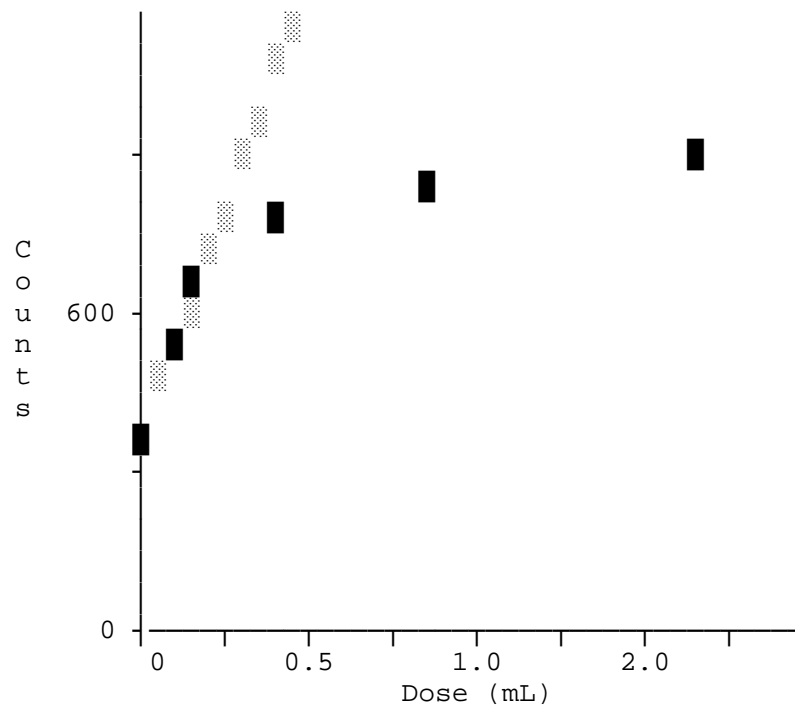
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: Record 7

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1961
Test Sample Name: pH 3 stripped wastewater
Tester Strain: TA104+S9



■ = Observed; ▨ = Predicted.

The predicted values are based on Bernstein model.

SALANAL: Record 8

Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
 Source/Batch/Lot:
 Solvent: None
 Exp. Date: 12/01/07
 Exp. No.: 1962
 Technician: CMR
 Assay Type: Pre-incubation - Time [30 minutes] Temp [37oC]
 Strain: TA104+S9

Metabolic activation species..... R
 organ L
 inducer A
 S9 concentration ... 0.50

Data File Name: C:\SALANAL\1962A

Code	Dose	--	counts		--		Mean	S.D.	Predicted Bernstein
	0.00	384	388	392	377	302	368.60	37.64	366.20
	0.10	495	457	492			481.33	21.13*	493.29
	0.20	642	610	636			629.33	17.01**	620.39
	0.50	710	672	682			688.00	19.70**	
	1.00	756	798	780			778.00	21.07**	
	2.00	722	700	734			718.67	17.24**	
p	2.50	850p	860p						

Note: ** = significant at 1%; *significant at 5%

P-value for ANOVA test of dose response < .001

Bernstein P-value = 0.933.

The Bernstein model is a good fit.

Bernstein model used the first 3 doses

Estimate of the slope is = 1270.985539 .

Standard error of the slope is = 105.088183 .

90% confidence limits for the slope are <1085.871160, 1456.099918>.

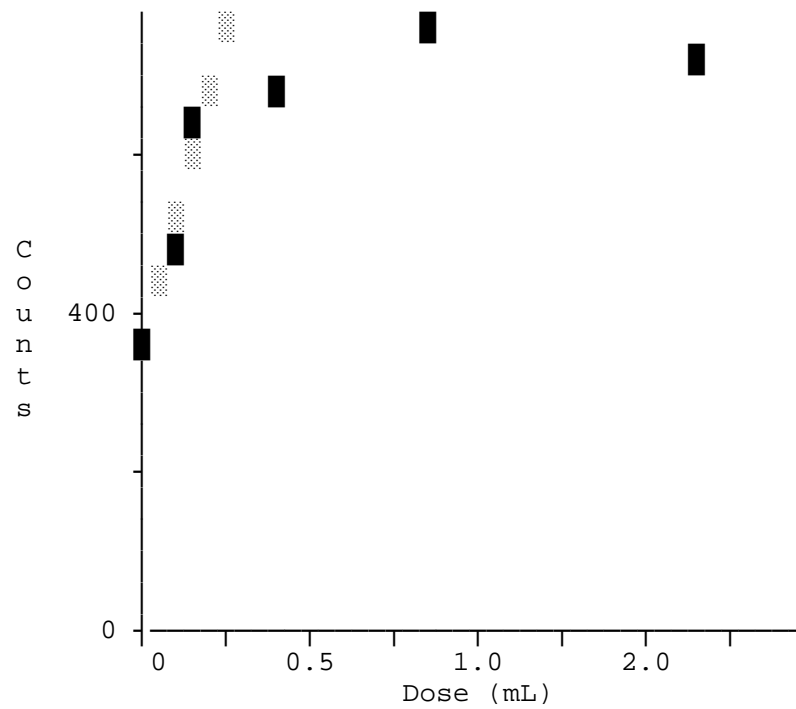
P-value for the test of the positive dose response

(slope at origin) is < .001

Note: Smaller P-value means more positive dose response

SALANAL: Record 8

Experiment Date: 12/01/07
Experiment #: 1962
Test Sample Name: pH 11 stripped wastewater
Tester Strain: TA104+S9



■ = Observed; ▨ = Predicted.
The predicted values

CAPÍTULO 3

Evidências da volatilização de compostos tóxicos presentes em
um efluente da fabricação de resinas de poliéster durante
tratamento aeróbio

Evidências da volatilização de compostos tóxicos presentes em um efluente da fabricação de resinas de poliéster durante tratamento aeróbio

Evidences of the volatilization of toxic compounds of a polyester manufacturing industry wastewater during aerobic treatment

Resumo

Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) podem ser transferidos para a atmosfera em processos de tratamento aeróbios. O presente trabalho utilizou uma abordagem orientada por toxicidade para caracterização de um efluente de uma indústria fabricante de resinas de poliéster. Foi verificado que COVs são responsáveis por uma fração significativa da toxicidade desse efluente. Um ensaio de biodegradação /volatilização forneceu evidências da volatilização de COVs tóxicos em sistemas de tratamento aeróbios. Foram identificados compostos mutagênicos entre os COVs por meio de cromatografia gasosa / espectrometria de massa (CG/EM). Recomenda-se o pré-tratamento do efluente para retirada de COVs antes da entrada do mesmo em sistema de tratamento aeróbio, ou alternativamente, a captação e tratamento dos gases emitidos em tanque de aeração.

Palavras-chave: Toxicidade, efluente da fabricação de poliéster, compostos orgânicos voláteis, tratamento aeróbio.

Abstract

Volatile Organic Compounds (VOCs) may be transferred to the atmosphere during aerobic treatment processes. In this work, a toxicity oriented approach was used for characterization of a polyester manufacturing industry wastewater. It was verified that VOCs are responsible for a significant fraction of this wastewater toxicity. A biodegradation /volatilization assay provided evidences of volatilization of VOCs in aerobic treatment systems. Chromatographic and Mass Spectrometric analyses revealed mutagenic compounds among VOCs. Either wastewater pretreatment for VOCs removal before entrance in an aerobic system, or aeration basin off-gas collection and treatment are recommended.

Keywords: Toxicity, polyester manufacturing industry wastewater, volatile organic compounds, aerobic treatment.

1. INTRODUÇÃO

Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) podem ser transferidos para a atmosfera em processos de tratamento aeróbios (Parker *et al.*, 1993) e portanto devem ser compostos de interesse para o controle de poluição do ar. Preocupações sobre potenciais emissões de compostos tóxicos para a atmosfera resultaram, em países desenvolvidos, no desenvolvimento de mecanismos de controle de emissões. Nos EUA, o "Clean Air Act" resultou na legislação denominada "National Emission Standards for Hazardous Air Pollutants" (NESHAP). No Brasil, apesar de não existir ainda legislação específica neste sentido, a transferência de compostos tóxicos para a atmosfera em estações de tratamento aeradas deve ser também motivo de preocupação, investigação e ações preventivas.

A extensão da volatilização em tanques de aeração é determinada por propriedades físicas e químicas dos COVs e também pelo tipo de estação de tratamento e sua respectiva operação (Parker *et al.*, 1993). Em geral, compostos com cloro são removidos predominantemente por volatilização em lodos ativados, enquanto compostos não-clorados são em parte volatilizados e em parte biodegradados (Kincannon *et al.*, 1983; Weber, Jones & Katz, 1987). O tipo de aeração empregada, se superficial ou por ar difuso, influencia significativamente a taxa de volatilização, sendo que a primeira favorece mais este fenômeno (Eckenfelder, 2000).

O presente trabalho faz parte de um estudo de caso que visa gerar subsídios teóricos para direcionar o controle de poluição da água em uma indústria química orgânica, produtora de resinas plásticas de poliéster. Literatura específica sobre o efluente produzido por este tipo de indústria é rara e baseada principalmente em análises químicas específicas (Meriç *et al.*, 1999). Sabe-se, no entanto, que a indústria química orgânica é de grande importância em termos de impactos ambientais, e que seus efluentes normalmente possuem alta carga orgânica, bem como substâncias tóxicas.

O efluente de processos para produção de resinas plásticas de poliéster consiste em água produzida durante a reação de esterificação, contaminada com subprodutos desta reação (Minor, 1974). Na indústria estudada, o efluente consiste em uma mistura de diversas águas de processo resultantes de diferentes reações de esterificação feitas em batelada. Cada resina de poliéster é feita de acordo com a demanda comercial e gera uma respectiva água de processo.

As características de águas de processo geradas na produção de diferentes resinas podem variar dependendo das condições de reação e das matérias-primas utilizadas. Reações diferentes para produção da mesma resina geram basicamente a mesma água de processo. São utilizados glicóis e ácidos orgânicos (com dois grupos funcionais) que se polimerizam formando as fibras de poliéster. Alguns dos glicóis utilizados são etilenoglicol, propilenoglicol e 1,4-butanodiol. O ácido orgânico mais utilizado é o ácido adípico.

Este efluente é encaminhado para tratamento em uma grande estação de uma concessionária de saneamento no estado de São Paulo, juntamente com esgoto sanitário e outros efluentes industriais. Com o objetivo de tratar seus efluentes em seu próprio *site*, a indústria contratou uma consultoria que indicou a tecnologia de lodos ativados, provavelmente por se tratar de uma modalidade muito versátil e comprovadamente eficiente no tratamento dos mais diversos tipos de águas residuárias. A construção dessa estação encontra-se atualmente em andamento.

No sentido de se garantir o sucesso do tratamento, estudos específicos relacionados ao efluente foram conduzidos. Efluentes industriais são normalmente contaminados com uma infinidade de substâncias químicas diferentes. Uma vez que quase sempre não se tem um conhecimento *a priori* de quais compostos tóxicos relevantes estão de fato presentes, como no caso do presente estudo, somente a utilização de análises químicas específicas para alguns poluentes prioritários não é uma ferramenta apropriada para fornecer informações sólidas que direcionem seu tratamento. Ao invés disso, uma ligação entre dados de efeitos tóxicos com compostos perigosos presentes se faz necessária.

Para tanto, foi utilizada uma abordagem orientada por toxicidade, que apesar de já estar consolidada em países desenvolvidos (USEPA, 1988), ainda é pouco utilizada no Brasil. Este tipo de abordagem é baseada numa combinação de técnicas de fracionamento, testes de toxicidade e métodos de análise química (Brak, 2003). Pode-se executar, por exemplo, o fracionamento do efluente por meio de diversos pré-tratamentos, para então testar a toxicidade de cada fração (Figura 1). Os resultados, por sua vez, direcionam as análises químicas. O objetivo final é definir qual ou quais são os elementos, compostos ou substâncias responsáveis pela toxicidade do efluente.

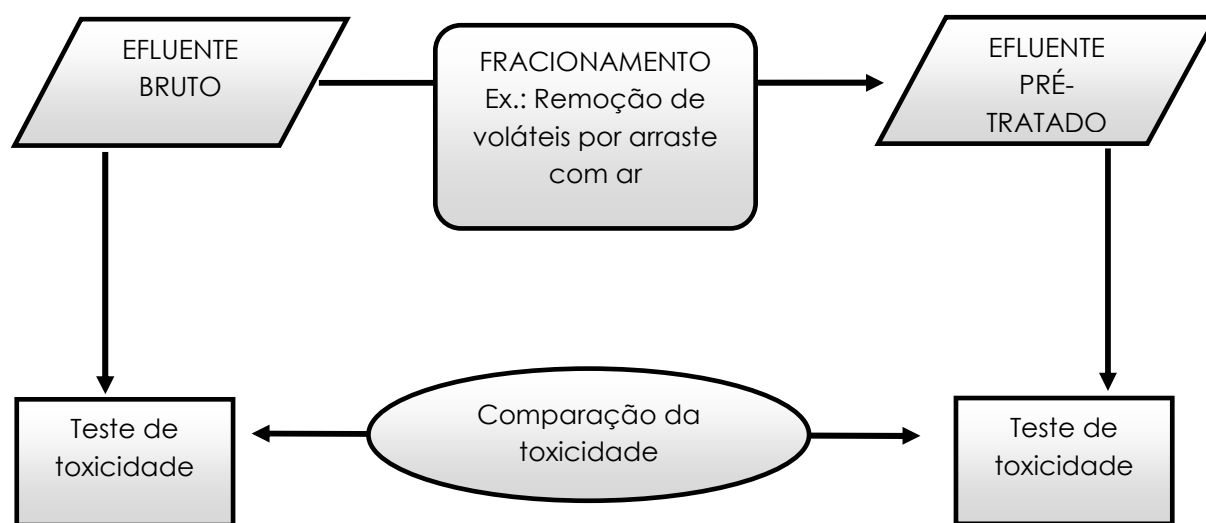


Figura 1. Esquema de estudo de toxicidade das frações de um efluente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Para a obtenção de uma amostra representativa para os estudos, as águas de processo foram misturadas proporcionalmente à sua produção anual ou mensal. A produção de resinas por produto no período de um ano foi levantada. Calculou-se a média anual de cada produto (em porcentagem relativa ao total produzido). As médias anuais foram comparadas com as médias mensais e verificou-se que eram similares. Verificou-se também que as 8 resinas mais produzidas perfizeram mais de 80 % da produção anual. Com isso, foi composto um efluente representativo juntando as águas de processo dessas oito linhas de produção utilizando proporções similares às observadas no levantamento. As proporções anuais observadas e as utilizadas para compor o efluente combinado estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Proporções anuais observadas e utilizadas para compor o efluente combinado.

Resinas	Proporção anual (%)	Proporção utilizada (%)
I	15	15
II	14	15
III	13	15
IV	13	15
V	8	12
VI	8	8
VII	7	10
VIII	4	10

No caso das resinas V e VIII, a escolha da proporção utilizada não se baseou na proporção média anual, e sim na proporção mensal máxima observada durante o período de um ano. Isso porque, segundo informações da indústria, se tratavam de águas de processo bem mais concentradas (em Demanda Química de Oxigênio - DQO) do que a média das outras linhas. A concentração de DQO por vezes é proporcional à toxicidade de um efluente industrial (Eckenfelder, 2000).

2.2. Análises físicas e químicas do efluente

As análises físicas e químicas foram realizadas de acordo com Standard Methods (APHA/AWWA/WEF, 1998), exceto quando expresso o contrário. As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram feitas pelo método do refluxo aberto. Uma vez que o efluente contém compostos tóxicos e que as reações que o produzem

se dão em reatores herméticos, a uma temperatura elevada (200°C), foi assumido que seria necessária a adição de inóculo para a determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Para tanto, a água de diluição utilizada no bioensaio foi inoculada com 0,2 ml L⁻¹ de uma cultura originária de lodo ativado, adaptada por um mês a diluições crescentes de efluente até 20 % (v/v). Foram utilizados os seguintes métodos analíticos: Fenóis – método de extração com clorofórmio e método colorimétrico com 4-aminoantipirina; Nitrogênio amoniacal – método da destilação e titulometria; Óleos e graxas – Método de extração Soxhlet; Sólidos – método gravimétrico. A condutividade foi medida com um condutivímetro Orion, modelo 150.

2.3. Fracionamentos utilizados

Foram realizados procedimentos de arraste com ar em pH 3, 7 e 11 (Bitton, 1994). Os fracionamentos foram realizados a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). Aproximadamente 200 mL de efluente foram ajustados ao pH desejado e deixados por cerca de 15 horas, com agitador magnético, em Erlenmeyers de 500 mL. Então, ar foi bombeado através de uma pedra porosa por 45 minutos, a uma taxa de aplicação de aproximadamente 3 L min⁻¹. Antes dos testes de toxicidade, o pH foi ajustado novamente para $7,0 \pm 1,0$.

2.4. Testes respirométricos de toxicidade

O material biológico utilizado nos testes foi o conteúdo de um reator aeróbio de bancada com 3 litros de volume útil. O volume do reator foi, por sua vez, inicialmente preenchido com lodo ativado de uma planta piloto que tratava esgoto predominantemente doméstico e mantido pelo tempo necessário para conduzir todos os ensaios. Ao final de cada dia, mistura (feita através de barra magnética) e aeração (ar bombeado através de pedra porosa) eram interrompidas. Depois de um período de sedimentação, 1,5 L era descartado e o mesmo volume de meio de cultura era adicionado. Tal meio consistia de extrato de levedura e peptona em concentrações de 500 e 150 mg L⁻¹, respectivamente.

O procedimento para o teste de toxicidade foi uma adaptação do método OECD nº 209 (OECD, 1984). Os ensaios foram conduzidos em batelada em recipientes de vidro de 500 mL, a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) conforme mostrado na Figura 2. O pH foi mantido em $7,0 \pm 1,0$.

As medições de oxigênio dissolvido para cálculo da Taxa de Utilização de Oxigênio (TUO) ou taxa de respiração, foram feitas por meio do método do eletrodo de membrana com um oxímetro portátil YSI Modelo 55 (Yellow Springs, Ohio), seguindo as instruções do fabricante para calibração.

Cada ensaio teve um volume útil de 400 mL, sendo 200 mL de licor do reator e 200 mL de solução controle ou efluente bruto ou pré-tratado. Ar foi borbulhado através

de uma pedra porosa por meio de um compressor de aquário e a mistura foi feita com agitação magnética. Após a adição do líquido do reator e da solução controle ou efluente bruto ou pré-tratado, o recipiente foi aerado até que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) estivesse perto da saturação. Então, a aeração foi interrompida e a concentração de OD foi registrada em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos. A solução controle consistiu de extrato de levedura e peptona nas mesmas concentrações da alimentação do reator de bancada. Foram testados: efluente bruto e efluente após arraste com ar em pH 3, 7 e 11.



Figura 2. Material utilizado nos testes respirométricos de toxicidade, da esquerda para a direita em sentido horário: medidor de oxigênio dissolvido; agitador magnético; garrafa com capacidade para 500 mL; bomba de ar e mangueira com ponteira de pedra porosa; cronômetro.

Considerando-se que a TUO é dada pelo coeficiente angular da reta obtida plotando-se a concentração de OD pelo tempo, é possível estabelecer, para todas as soluções testadas, o efeito de inibição instantânea da taxa de respiração observada no controle, por meio da Equação 1 (Mrafkova *et al.*, 2003):

$$I (\%) = (1 - TUO_t / TUO_c) \times 100 \quad (1)$$

Sendo I o efeito de inibição instantânea da taxa de respiração observada no controle (TUOc) e TUOt a taxa de respiração observada com cada solução testada. A comparação da inibição observada testando-se o efluente bruto (I_b) e as outras

substâncias teste (I_t) permite o cálculo da redução da inibição (RI) devido à cada fracionamento, por meio da Equação 2 (Mrafkova *et al.*, 2003):

$$RI (\%) = (1 - I_t / I_b) \times 100 \quad (2)$$

Para que se tivesse uma idéia da magnitude da inibição da respiração causada pelo efluente bruto, diferentes diluições do mesmo foram testadas no primeiro dia de experimento. A diluições que apresentou uma inibição de aproximadamente 50 % foi adotada para os testes nos dias subseqüentes, tanto para o teste com efluente bruto quanto para as soluções de efluente pré-tratado. Água da rede pública foi usada para diluição. Os sólidos em suspensão voláteis (SSV) de cada teste não foram quantificados, mas precauções foram tomadas no sentido de garantir que a quantidade e a qualidade da biomassa testada fosse sempre a mesma quando as comparações fossem feitas. Tal objetivo foi alcançado repetindo-se os testes com meio controle e efluente bruto antes de cada bateria de testes de soluções de efluente pré-tratado. Isso foi feito em cada um dos dias do experimento.

2.5. Ensaios de biodegradação /volatilização

Devido à toxicidade e possibilidade de volatilização de compostos presentes no efluente, foi realizado um ensaio que forneceu subsídios para compreender melhor a biodegradabilidade do efluente, bem como a provável volatilização de compostos tóxicos.

O conteúdo de um reator de lodos ativados em escala piloto, que tratava efluente predominantemente doméstico, foi adicionado em um reator de bancada e um Erlenmeyer, sendo 250 mL em cada. A cada um também foi adicionado 250 mL de substrato sintético OECD (OECD, 1984) em uma diluição tal, que a concentração final de DQO filtrada era de 525 mg/L e os volume final, de 500 mL. O SSV inicial de cada recipiente era de 1.320 mg/L.

O reator foi operado nas mesmas condições descritas no item 2.4. O Erlenmeyer foi incubado em um shaker orbital, a uma temperatura de 30°C, e 150 rpm. Após 24 horas, foi medida a DQO filtrada e SSV em cada recipiente. O conteúdo dos mesmos foi misturado transferido para uma proveta graduada de 1 L. Após período de sedimentação, 600 mL de sobrenadante foram retirados e adicionados 500 mL de substrato sintético OECD e 100 mL de efluente bruto. O conteúdo da proveta foi então dividido entre o reator e o Erlenmeyer e incubado da mesma maneira. A DQO filtrada inicial era de 2420 mg/L e o SST estimado em 1500 mg/L.

Após mais um período de 24 horas, a DQO filtrada e o SSV nos dois recipientes foram novamente quantificados. As análises de DQO nesta etapa do trabalho foram sempre realizadas após filtração em um filtro GF/C de fibra de vidro que retém partículas maiores que 1,2 μ m (Schleicher & Schuell), e o método utilizado foi o do

refluxo fechado. Os resultados de DQO obtidos são, em sua maioria, médias de dois valores.

2.6. Análise de compostos orgânicos voláteis por CG/EM

Foram feitas análises dos compostos volatilizados do efluente em pH 3 e pH 11, utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM). Para cada pH, 10 mL de amostra foram transferidos a um frasco de extração, com volume de 24 mL (Chromatography Research Supplies), e tampados com septo de silicone com a face interna de PTFE. Para a extração dos compostos voláteis foi utilizada a técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) no espaço confinado (*headspace*) entre a amostra e frasco vedado. A fibra de revestimento misto Carboxen-PDMS, de 75 μm de espessura de filme e 10 mm de comprimento (Supelco, Bellefonte, PA, USA), foi utilizada neste estudo. A fibra de SPME foi pré-condicionada a 280 °C por 60 min no injetor do cromatógrafo gasoso. No isolamento dos voláteis, a agulha do sistema de SPME foi introduzida no frasco com a amostra através do septo e exposta no *headspace*. O tempo de exposição da fibra no *headspace* das amostras foi de 45 minutos a temperatura de 30 °C, sob agitação. Após término desse período, a fibra foi removida do frasco e inserida no injetor do CG para serem realizadas as análises instrumentais. Antes da exposição da fibra no *headspace*, o frasco com a amostra foi imerso em banho-maria na mesma temperatura de extração (30 °C) por 15 minutos. Os compostos voláteis das amostras foram separados e identificados em um cromatógrafo a gás (SHIMADZU, GC-17A) acoplado a um espectrômetro de massas (SHIMADZU, GC-MS QP-5000). A dessorção térmica dos compostos voláteis da fibra de SPME foi realizada a uma temperatura de 290 °C, em um injetor do tipo *split/splitless* no modo *splitless* por 2 min e, depois deste período a válvula manteve uma divisão de 1:20. A fibra foi mantida no injetor por 10 min para eliminar o efeito memória. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida de fase apolar, DB-1 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária (J&W Scientific, Folsom, Califórnia, USA). O gás de arraste foi o hélio, sob vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. A programação de temperatura de aquecimento da coluna iniciou a 30 °C e, foi mantida por 5 min, em seguida, iniciando uma rampa de 1,5 °C min⁻¹ até atingir 80 °C, depois uma segunda rampa de 6 °C min⁻¹ até 200 °C e assim permaneceu por 5 min. A temperatura da interface CG-EM foi mantida a 240 °C. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura de 35 a 350 *m/z* e a voltagem do detector foi de 1,2 kV. Os compostos foram tentativamente identificados pela comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles fornecidos pela biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST 98).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises Físicas e Químicas

Os resultados das análises físicas e químicas realizadas no efluente encontram-se na Tabela 2. Algumas informações importantes são fornecidas por estes resultados. A relação $\text{The DBO}_5/\text{DQO}$ é de 0,16. Isso indica que a matéria orgânica facilmente assimilável é somente uma pequena fração da matéria orgânica presente no efluente. Os resultados também mostram uma razão C:N:P (C como DBO_5) de 100 : 0.06 : 0.007. Adição de nutrientes será necessária para o tratamento biológico deste efluente.

No entanto, não se pode obter nenhuma conclusão prática sobre as fontes e a natureza da toxicidade do efluente somente com a caracterização física e química do mesmo.

Tabela 2. Resultados das análises físicas e químicas realizadas.

Parâmetro	Unidade	Resultado
pH	-	3,0 a 3,1
ST	mg L ⁻¹	386 ± 15
SV	mg L ⁻¹	276 ± 23
SF	mg L ⁻¹	60 ± 10
SST	mg L ⁻¹	4 ± 1
SSV	mg L ⁻¹	3 ± 1
SSF	mg L ⁻¹	1 ± 0,5
Condutividade	μS cm ⁻¹	94 ± 1
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	83.933 ± 2.050
DBO ₅	mg O ₂ L ⁻¹	13.508 ± 793
Óleos e Graxas	mg L ⁻¹	16 ± 2
Fósforo Total	mg L ⁻¹	1 ± 0,2
Nitrogênio Amoniacal	mg NH ₃ -N L ⁻¹	4,7 ± 0,6
Nitrito	μg NO ₂ ⁻ -N L ⁻¹	11 ± 1
Nitrogênio Kjeldahl Total	mg N L ⁻¹	8 ± 1
Fenóis Totais	μg fenol L ⁻¹	122 ± 4

3.2. Testes respirométricos de toxicidade

Na Tabela 3 são mostrados os resultados dos testes respirométricos de toxicidade após cada um dos fracionamentos realizados.

Tabela 3. Resultados dos testes respirométricos de toxicidade após fracionamentos. TUO_t : taxa de respiração observada com o respectivo fracionamento; TUO_c : taxa de respiração observada com a solução controle ; I_t : inibição da respiração observada no controle causada pelo efluente pré-tratado; I_b : inibição da respiração observada no controle causada pelo efluente bruto; RI : redução da inibição devido ao fracionamento.

Fracionamento	TUO_t	TUO_c	I_t (%)	I_b (%)	RI (%)
Arraste com ar / pH 3,0	0,143	0,337	57,6	66,4	13,3
Arraste com ar / pH 7,0	0,154	0,337	54,3	66,4	18,2
Arraste com ar / pH 11,0	0,253	0,337	24,9	66,4	62,5

Os resultados mostram que o fracionamento com arraste com ar teve eficiência relevante na remoção da toxicidade (> 10 %) nas três condições testadas. Este tipo de teste fornece informações quanto à toxicidade do efluente ser causada por compostos voláteis ou que sofrem oxidação. Arraste com ar em pH 3 (pH original do efluente) reduziu a toxicidade aos microrganismos em 13,3 %. Houve uma correlação positiva entre aumento no pH do tratamento e redução da toxicidade. No entanto, tal correlação não é linear, já que a diferença entre a diminuição da toxicidade entre pH 3 e 7 e entre pH 7 e 11 é de 39,3 %. O resultado observado no arraste com ar em pH 11 é notável, uma vez que os compostos excluídos por este tipo de fracionamento respondem por aproximadamente 60 % da toxicidade instantânea do efluente bruto à bactérias de lodos ativados não adaptadas.

Foram feitas suposições sobre a identidade dos compostos tóxicos presentes no efluente, que foram removidos com arraste com ar em pH 11. Compostos oxidáveis por introdução de ar foram inicialmente descartados, já que a quantidade de ar introduzida foi a mesma nos três diferentes fracionamentos de arraste com ar, e se este fosse o caso, uma redução de toxicidade mais similar seria observada entre esses testes.

A amônia é um poluente tóxico que tem como característica a remoção por arraste com ar em pH básico. No entanto, a concentração de nitrogênio amoniacal encontrada no efluente (4,7 mg/L) é muito baixa para causar o efeito tóxico observado (Dorn, 1992). A hipótese da amônia foi, portanto, descartada.

Outra possibilidade foi investigada: se o composto tóxico foi volatilizado ou se somente sofreu hidrólise alcalina e perdeu sua toxicidade. Um último teste respirométrico de toxicidade foi realizado, nas mesmas condições descritas previamente, onde o fracionamento consistiu apenas de elevação de pH até 11, mistura e neutralização. O resultado foi uma redução de toxicidade de apenas 3 %. Logo, esta hipótese também foi descartada.

A hipótese remanescente e também mais consistente para a identidade dos compostos tóxicos era de se tratarem de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) em pH básico. Foi feita análise de voláteis no efluente em pH 3 e 11, por CG/EM. Os resultados

demonstram COVs em pH 11 que não foram detectados em pH 3 (Figura 3). Estes COVs são potenciais responsáveis por uma fração significativa da toxicidade do efluente estudado.

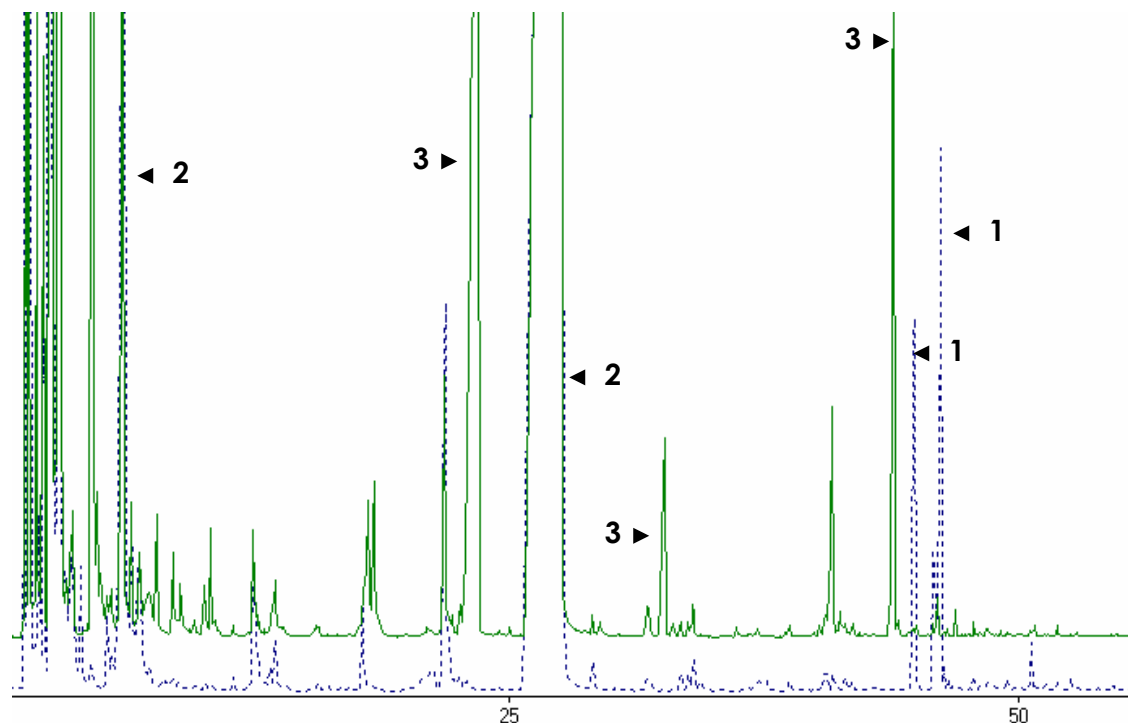


Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas de COVs em pH 3 (linha tracejada) e em pH 11 (linha contínua). [1] COVs volatilizados em pH 3 mas não significativamente em pH 11; [2] COVs volatilizados em pH 3 e 11; [3] COVs volatilizados somente em pH 11.

3.3. Ensaio de biodegradação /volatilização

Na Tabela 4 são mostrados os resultados obtidos nesse ensaio. Após 24 horas, a DQO filtrada do conteúdo do reator e do conteúdo do Erlenmeyer foram de 120 e 125 mg/L, respectivamente. Ou seja, houve uma remoção praticamente idêntica ($\approx 77\%$) nos dois recipientes. O SSV após 24 horas foi de 1600 e 1400 mg/L, no reator e no Erlenmeyer, respectivamente, demonstrando acréscimo no inventário de biomassa, como era esperado. Após o segundo período de 24 horas, quando se adicionou 10 % (v/v) de efluente à alimentação dos recipientes, os resultados foram bastante distintos. Aparentemente, a eficiência do reator de bancada na remoção de DQO muito maior do que a eficiência da incubação em *shaker* orbital. No entanto, esse não deve ser o caso, já que as eficiências no primeiro período de 24 horas, quando alimentados com substrato não volátil, foram iguais. Ou seja, a grande diferença nas eficiências da segunda incubação deve-se à natureza do efluente e ao modo de transferência de oxigênio distinto nos dois recipientes.

Tabela 4. Resultados de DQO (mg/L), SSV (mg/L) e eficiência (%) na remoção de DQO obtidos no ensaio de biodegradação / volatilização.

Tipo de Incubação	Alimentação					
	Esgoto doméstico sintético OECD			Esgoto doméstico sintético OECD + 10 % (v/v) de efluente bruto		
	Início	24 horas	Eficiência	Início	24 horas	Eficiência
Reator de bancada	DQO/SSV 525/1320	DQO/SSV 120/1600	77 %	DQO/SSV 2420/1500	DQO/SSV 385/1400	84 %
Shaker orbital	DQO/SSV 525/1320	DQO/SSV 125/1400	76 %	DQO/SSV 2420/1500	DQO/SSV 1475/1000	39 %

Em um *shaker* orbital, a transferência de oxigênio se dá principalmente quando se forma uma fina película de líquido na parede do frasco, o que aumenta a superfície de contato ar/ líquido. Embora concentrações de oxigênio dissolvido (OD) relativamente baixas predominem nesse tipo de incubação, isso não é fator limitante para o metabolismo aeróbio (Breznak & Costilow, 1994). Já com a introdução de ar por meio de bolhas, as concentrações de OD tendem a ser maiores, assim como a turbulência, e conseqüentemente, a volatilização de compostos presentes na solução. Esse parece ser o caso do ensaio em questão. Uma vez que o efluente possui grande quantidade de matéria orgânica dissolvida, e que grande parte desses compostos são voláteis (o que pode ser verificado pelo forte odor do efluente, bem como por meio dos resultados obtidos de redução de toxicidade com arraste com ar), a queda acentuada na DQO do conteúdo do reator deve-se principalmente à volatilização. O mesmo não ocorreu tão intensamente na incubação em *shaker*, e por isso a eficiência de remoção de DQO nesse caso foi menor.

Outro fator de distinção observado foi a dinâmica da biomassa, mostrada indiretamente pelo valor de SSV. Enquanto verificou-se um acréscimo de biomassa nas primeiras 24 horas, houve decréscimo em ambos os casos no segundo período de incubação. Esse fenômeno pode estar relacionado com a toxicidade do efluente mesmo em concentração de 10 %. Contudo, verificou-se um decréscimo muito mais intenso na incubação em *shaker*. Isso pode ser uma evidência de que os compostos voláteis são de fato tóxicos, já que onde os mesmos foram perdidos rapidamente para a atmosfera (incubação em reator) a quantidade de SSV não apresentou decréscimo tão acentuado. Já no caso da incubação em *shaker*, a biomassa teve contato por mais tempo com tais compostos, que não sofreram volatilização tão intensa devido às condições mais brandas de introdução de oxigênio.

Entre as duas condições de incubação estudadas, a que se assemelha mais às condições observadas em um tanque de aeração de lodos ativados é a incubação

em reator de bancada. Justamente nesta condição, observaram-se evidências de volatilização de compostos aparentemente tóxicos.

3.4. Implicações das evidências de volatilização

Analisando-se as evidências mostradas pelos resultados, conclui-se que existe a possibilidade de volatilização de compostos tóxicos no tanque de aeração de lodos ativados destinado a tratar tal efluente. Poder-se-ia argumentar que os compostos mais tóxicos são somente volatilizados em pH muito básico, uma condição que dificilmente aconteceria em um tanque de aeração que tem seu pH rigorosamente controlado. No entanto, conforme demonstrado na Figura 4, foram encontrados alguns compostos que são volatilizados tanto em pH 3 como também em pH 11.

Como já era esperado para o caso de uma amostra ambiental (efluente), a maioria dos COVs não pôde ser identificada por meio de CG/EM, pois as bibliotecas de espectros, apesar de extensas, obviamente não contém todos os espectros de massas existentes. Dentre os compostos que são volatilizados significativamente, tanto em condições ácidas como em condições básicas (e provavelmente também em condições neutras), está o 2-etil 2-propenal, ou 2-etilacroleína (CAS 922-63-4), que foi tentativamente identificado por similaridade de seu espectro de massas com o padrão da biblioteca espectral (Figura 4). No cromatograma de COVs em pH 3 este composto corresponde ao pico com a quarta maior área, e no cromatograma de COVs em pH 11, ao pico com a sétima maior área. E isso em um total de mais de 150 picos detectados em cada cromatograma. Ou seja, este composto é um sério candidato à volatilização, em proporções significativas, em um tanque de aeração.

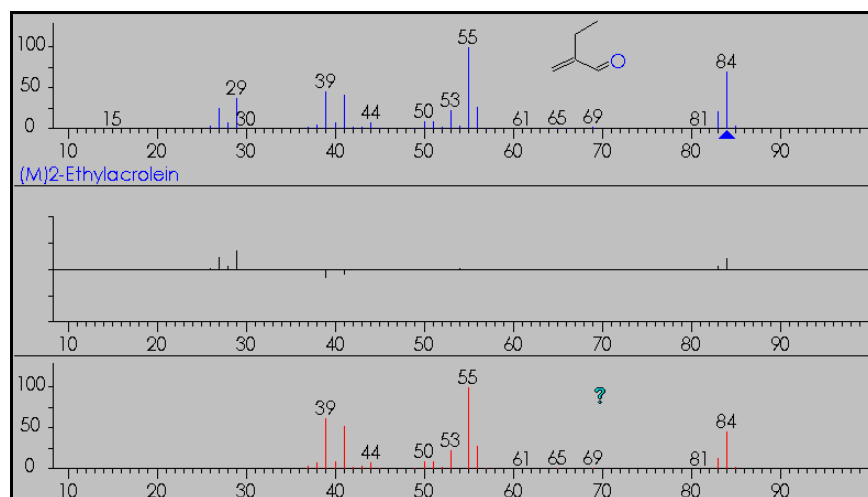


Figura 4. Comparação dos espectros de massas do padrão da 2-etilacroleína (no alto) e do COV presente no efluente (embaixo). O espectro do meio corresponde às diferenças entre os espectros comparados.

A acroleína (2-propenal) consta na lista de poluentes prioritários da United States Environmental Protection Agency (USEPA). É um aldeído de três carbonos que contém uma dupla insaturação entre o C2 e o C3. Além de tóxico (Dimitrov *et al.*, 2004), é também um composto mutagênico (Benigni, Passerini & Rodomonte, 2003). O composto 2-etilacroleína é uma molécula de acroleína com adição de um grupo etil (C₂H₅) ligado ao C2. Essa adição torna a molécula um pouco menos tóxica e menos mutagênica (Benigni, Passerini & Rodomonte, 2003; Neudecker *et al.*, 1991) que a acroleína. Por se tratar de um poluente não usual, não há registros de limites seguros de exposição ao homem. Mesmo se considerado o aumento na taxa de biodegradação com a adaptação da biomassa, ainda assim seria esperada a perda de aproximadamente 15 a 25 % da concentração afluyente por volatilização, em se tratando de um composto não clorado (Weber, Jones & Katz, 1987).

Além de potencial fonte de poluição do ar (Eckenfelder, 2000), os compostos voláteis afluentes às estações de tratamento são risco potencial à saúde de operadores (Bitton, 1994). Neste caso particular, os COVs demonstraram ser tóxicos até mesmo para uma biomassa de lodos ativados. Há inclusive suspeita fundamentada de que pelo menos alguns COVs sejam também mutagênicos. Outros estudos toxicológicos devem ser conduzidos para levantar os riscos de maneira precisa. No entanto, a remoção de COVs tóxicos deste tipo de efluente é recomendada antes da entrada do mesmo em uma estação de lodos ativados. Alternativamente, os gases emitidos no tanque de aeração poderiam ser captados e tratados, por exemplo, por incineração térmica ou catalítica, adsorção em carvão ativado ou biodegradação (Eckenfelder, 2000). Tais recomendações são feitas com o objetivo de se prevenir consequências danosas à saúde humana, que podem advir da provável volatilização indesejada de compostos perigosos.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com os fracionamentos do efluente estudado, seguidos de testes respirométricos de toxicidade, foi possível identificar que uma parcela significativa da toxicidade do efluente a microrganismos aeróbios não adaptados deve-se a Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Por meio de um ensaio de biodegradação /volatilização, foram obtidas evidências da ocorrência de volatilização de compostos tóxicos em um tanque de aeração se este efluente for enviado para tratamento em uma estação de lodos ativados. De acordo com análise de CG/EM, um dos COVs identificados foi a 2-etilacroleína, que além de toxicidade, apresenta também mutagenicidade. Recomenda-se um pré-tratamento do efluente para retirada de COVs antes da entrada do mesmo em algum tipo de sistema de tratamento aeróbio, ou alternativamente, a captação e tratamento dos gases emitidos no tanque de aeração.

5. REFERÊNCIAS

APHA/AWWA/WEF. *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater*. 20 ed. Baltimore, Maryland. United Book Press, Inc. 1998.

BENIGNI, R.; PASSERINI, L.; RODOMONTE, A. Structure-activity relationships for the mutagenicity and carcinogenicity of simple and α - β unsaturated aldehydes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 42, p. 136-143. 2003.

BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. New York, NY. Wiley-Liss, Inc. 478 p, 1994.

BRACK, W. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, p. 397-407. 2003.

BREZNAK, J. A.; COSTILOW, R. N. Physicochemical factors of growth. In: *Methods for general and molecular bacteriology*. GERHARDT, P. Editor-in-chief. 2 ed. Washington, DC. ASM, 791 p, 1994.

DIMITROV, S. *et al.* Interspecies quantitative structure-activity relationship model for aldehydes: aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 2, p. 463-470. 2004.

DORN, P. B. Case histories – The petroleum refining industry. In: Ford, D. L. (Ed.). *Toxicity Reduction: Evaluation and Control*. Lancaster, PA. Technomic Publishing Company Inc., p. 183-224, 1992.

ECKENFELDER, JR., W.W. *Industrial Water Pollution Control*. 3 ed. Boston. McGraw Hill, 584 p, 2000.

KINCANNON, D. F. *et al.* Removal mechanisms for toxic priority pollutants. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, v. 55, n. 2, p. 157-183. 1983.

MERİÇ, S. *et al.* Treatability of strong wastewaters from polyester manufacturing industry. *Water Science & Technology*, v. 39, p. 1-7. 1999.

MINOR, P. S. Organic chemical industry's waste waters. *Environmental Science & Technology*, v. 8, p. 620-625. 1974.

MRAFKOVA, L. *et al.* Preliminary evaluation of inhibitory effects of some substances on aerobic and anaerobic treatment plant biomasses. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 17, p. 243-247. 2003.

NEUDECKER, T. *et al.* Mutagenicity of 2-methylacrolein, 2-ethylacrolein and 2-propylacrolein in *Salmonella typhimurium* TA100. A comparative study. *Mutation Research*, v. 264, n. 4, p. 193-196. 1991.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Activated sludge, respiration inhibition test. Guidelines for Testing of Chemicals. OECD Method 209. Paris, France. 1984.

PARKER, W. J. *et al.* Fate of volatile organic compounds in municipal activated sludge plants. *Water Environment Research*, v. 65, n. 1, p. 58-65. 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation – Phase I, Toxicity Characterization Procedures. Duluth, MN, 1988.

WEBER, JR., W. J.; JONES, B. E.; KATZ, L. E. Fate of toxic organic compounds in activated sludge and integrated pac systems. *Water Science and Technology*, v. 19, p. 471-481. 1987.

CAPÍTULO 4

Difference on the observed acute toxic effect of volatile organic compounds in polyester manufacturing wastewater to aerobic and anaerobic treatment plant biomasses

Difference on the observed acute toxic effect of volatile organic compounds in polyester manufacturing wastewater to aerobic and anaerobic treatment plant biomasses

Abstract

Biological treatment of industrial wastewaters can be inhibited by a series of toxic substances inherent of the production process. A preliminary distinction must be made between inhibitions related to aerobic and anaerobic biomasses, for biomass metabolism and toxicity resistance in aerobic and anaerobic environments are rather different. In this study, a polyester resin manufacturing industry wastewater containing toxic volatile organic compounds was tested for toxicity with unadapted aerobic and anaerobic biomasses in similar concentrations. Among these volatile compounds, there were a series of α,β -unsaturated aldehydes. The wastewater was also tested after removal of toxic volatile compounds. The toxicity reduction observed when testing the aerobic biomass after toxicants removal was not observed in the anaerobic bioassay, thus indicating that the anaerobic biomass could assimilate the toxicity of volatile organic compounds present in this wastewater better than the aerobic biomass. By using simple and rapid bioassays, it was possible to preliminarily direct further studies to implement wastewater treatment in the industry.

Keywords: Polyester manufacturing wastewater; biological treatment; aerobic and anaerobic toxicity; volatile organic compounds; α,β -unsaturated aldehydes.

1. INTRODUCTION

Treatment plant biomass can be inhibited by toxic substances present in industrial effluents, thus negatively affecting plant efficiency.¹ Determining the inhibition characteristics of a given wastewater is useful to direct its treatment and/or pretreatment to the best available technology. A preliminary distinction must be made between inhibitions related to aerobic and anaerobic treatment plants biomasses, for metabolism and toxicity resistance in aerobic and anaerobic environments are rather different.²

Generally, while toxic effects on aerobic biomass reduce the oxygen uptake rate, the anaerobic process is first influenced on its limiting methanogenic phase. For these reasons a preliminary assay of toxicity can be deduced from the influence of toxic substances on overall biomass metabolism controlling respirometric or gas production behavior.^{3,4}

In a parallel research,⁵ a series of Volatile Organic Compounds (VOCs) in a polyester manufacturing industry wastewater were identified as the most significant source of toxicity to an activated sludge biomass. Another study identified a series of α,β -unsaturated aldehydes among these toxic VOCs by GC/MS analysis (Table 1).⁶ The wastewater was resultant of batch polymerization reactions producing polyester resins and is currently treated off site.

Wastewater fractionation by air stripping in pH 11 removed toxic VOCs (Figure 1) and reduced wastewater toxicity to activated sludge biomass. The goal of the present study was to assess if the same toxicity reduction would be observed by this fractionation technique when testing the effluent on an anaerobic biomass. By these results, a comparison of the toxicity of these VOCs to aerobic and anaerobic biomasses can be made.

Table 1. α,β -Unsaturated aldehydes identified among VOCs in a polyester manufacturing wastewater.

Name	CAS number
2-methyl 2-propenal (methacrylaldehyde)	78-85-3
2-butenal (crotonaldehyde)	4170-30-3
2-methyl 2-butenal [M]	497-03-0
2-methyl 2-butenal [R]	1115-11-3
2-pentenal	1576-87-0
2-ethyl 2-butenal	19780-25-7
2-methyl 2-pentenal	623-36-9
2-ethenyl 2-butenal	20521-42-0
2,4-hexadienal	142-83-6
2,4-heptadienal	4313-03 5

The procedures used in this work to assay biomass inhibition allow determining, to some extent, the acute toxicity effects of a series of compounds present in a polyester manufacturing industry wastewater and they don't consider the potential adaptability of the biomasses after an adequate acclimatization time. However, the results obtained can provide information about the inhibition effect on potential treatment plant biomasses, thus preliminarily directing further studies to implement wastewater treatment in the industry.

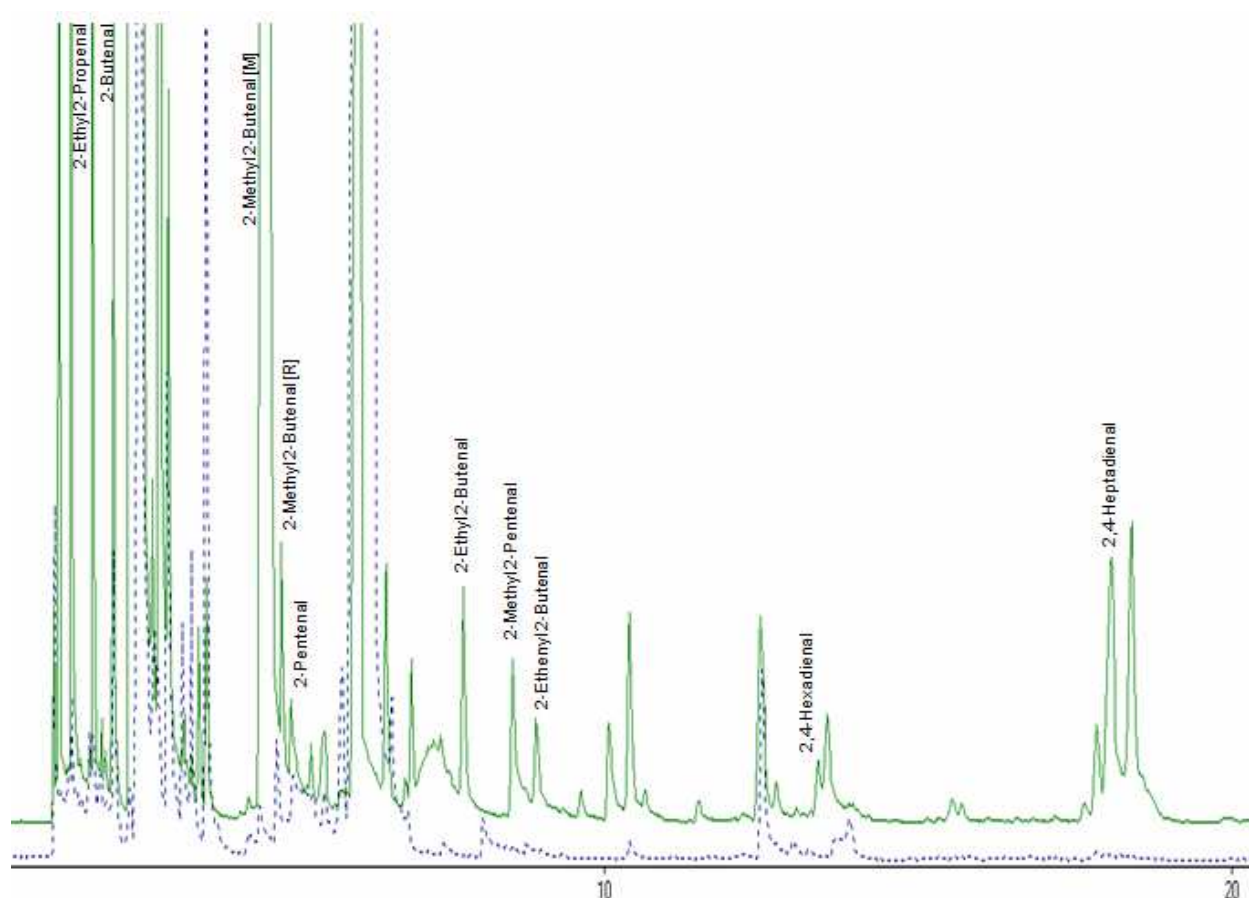


Figure 1. Headspace GC analysis of wastewater in the beginning (continued line) and at the end (traced line) of air stripping in pH 11. This fractionation technique removed toxic VOCs. Among them there were a series of α,β -unsaturated aldehydes. Chromatographic methods are described elsewhere.⁵

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Wastewater test solutions

The polyester manufacturing wastewater was tested for toxicity to aerobic and anaerobic biomasses in its original composition and after air stripping in pH 11, which removed a series of toxic VOCs, accordingly to the scheme presented in Figure 2. Details about fractionation procedures are described elsewhere.⁵

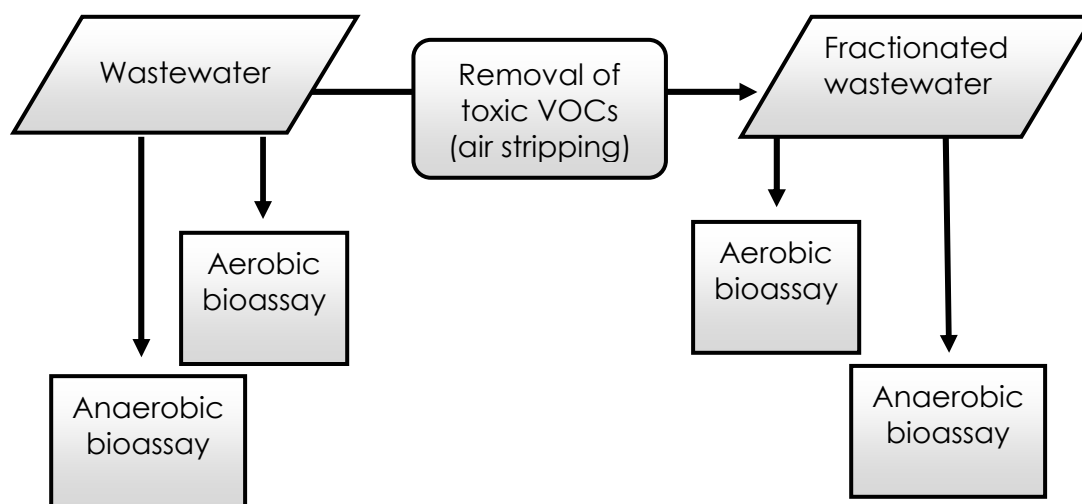


Figure 2. Scheme of the study.

2.2. Aerobic toxicity assay

The procedure for aerobic biotesting was based on a well established procedure, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) n° 209 Activated Sludge Inhibition Test.⁷ The mixed liquor of a laboratory sequencing batch reactor with 3 L of working volume was used. This reactor was filled with mixed liquor of an activated sludge pilot plant treating sewage and was maintained in the following manner: at the end of each day, mixing and aeration were stopped. After decanting, half of reactor volume was discarded and the same volume of fresh media was added. Media consisted of yeast extract and peptone in concentrations of 500 and 150 mg L⁻¹, respectively.

The respirometric assays were carried out as batch tests in 500 mL glass bottles at room temperature ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). The pH was 7.0 ± 1.0 . The measurement of dissolved oxygen concentration for oxygen uptake rate (OUR) calculation was made by the membrane

electrode method with a YSI Model 55 Handheld Dissolved Oxygen System (Yellow Springs, Ohio), following the manufacturer instructions for calibration.

Each assay had a working volume of 400 mL, being 200 mL of reactor mixed liquor, 160 mL of test solution and 40 mL of tap water, for achieving a wastewater dillution of 40 % v/v. This wastewater dillution was close to the EC50 in relation to a control substrate.⁵ The biomass concentration in each assay was ≈ 0.75 g/L SSV. Air was pumped through a porous stone at a rate of ≈ 3 L min⁻¹ and mixing was achieved by magnetic stirring. After addition of mixed liquor and test solution, the vessel was aerated until dissolved oxygen was close to saturation. Then, aeration was stopped and values of dissolved oxygen were registered at one minute intervals, during the following 10 minutes. By comparing the Oxygen Uptake Rate (OUR) of the biomass in contact with the original wastewater and the OUR of the biomass in contact with the fractionated wastewater, it was possible to measure the inhibition caused by the toxic VOCs present in the wastewater.

2.3. Anaerobic toxicity assay

Biomass of a pilot scale Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor treating sewage was used for the anaerobic toxicity assay. The anaerobic biomass was collected at the day of the beginning of the assay. The procedures used were adapted from Soto *et al.*⁸ Dark glass flasks of 300 mL capacity were filled with 65 mL of anaerobic granules and 35 mL of original or pre-treated wastewater, to a final wastewater dillution of 35 % (v/v) and a biomass concentration of ≈ 1.5 g/L SSV. Sodium bicarbonate and sodium sulfite were added in concentrations of 1.5 g/L and 0.1 g/L respectively. The pH was adjusted to 7.0 ± 0.1 with either HCl or NaOH, and each flask had its atmosphere filled with N₂. The flasks were sealed and incubated at 30°C, in duplicates. After 19:30, 24 and 27 hours, gas production was measured by liquid displacement (NaOH solution, 2.5 %), collected in a graduated cilinder (Figure 3). Theoretically, CO₂ and H₂S were trapped in the basic solution.

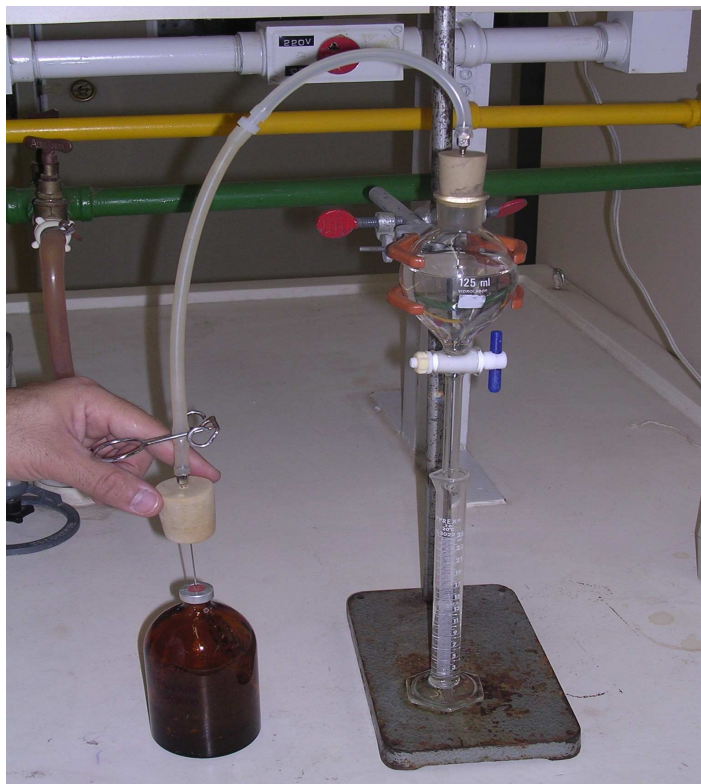


Figure 3. Anaerobic gas production measurement system.

2.4. Gas chromatography for methane production confirmation

Methane analyses were made only for presence confirmation and were not quantitative. The analyses were conducted in a gas chromatographer padronized for methane detection, equipped with a flame ionization detector (GC/FID), model HP6850A. The column used was a HP-Plot Al_2O_3 "S" (Agilent Technologies) with 0.53 mm of internal diameter (megabore), 15 μm film thickness and 50 m long. The run temperature program was isothermal (40°C) for 3 minutes. The injection was splitless. Temperature of both injector and detector was 250°C. Carrier gas was H_2 with a flow of 32 mL/min. Padronization was made by determining the retention time of 99.5 % purity methane standard gas (White Martins).

3. RESULTS

3.1. Aerobic toxicity assay

Given the OUR as the slope of dissolved oxygen concentration over time, it was possible to compare the OUR of the aerobic biomass in contact with wastewater before and after removal of the toxic VOCs (Figure 4). A mensurable increase in slope value was clearly observed, from 0.113, when exposing the biomass to the original wastewater, to 0.253, when the fractionated wastewater was tested. That means an increase in the OUR of the aerobic biomass with the removal of the toxic VOCs by fractionation. In other words, there was a significant decrease of toxicity of the wastewater to an unacclimated aerobic biomass when the toxic VOCs were removed.

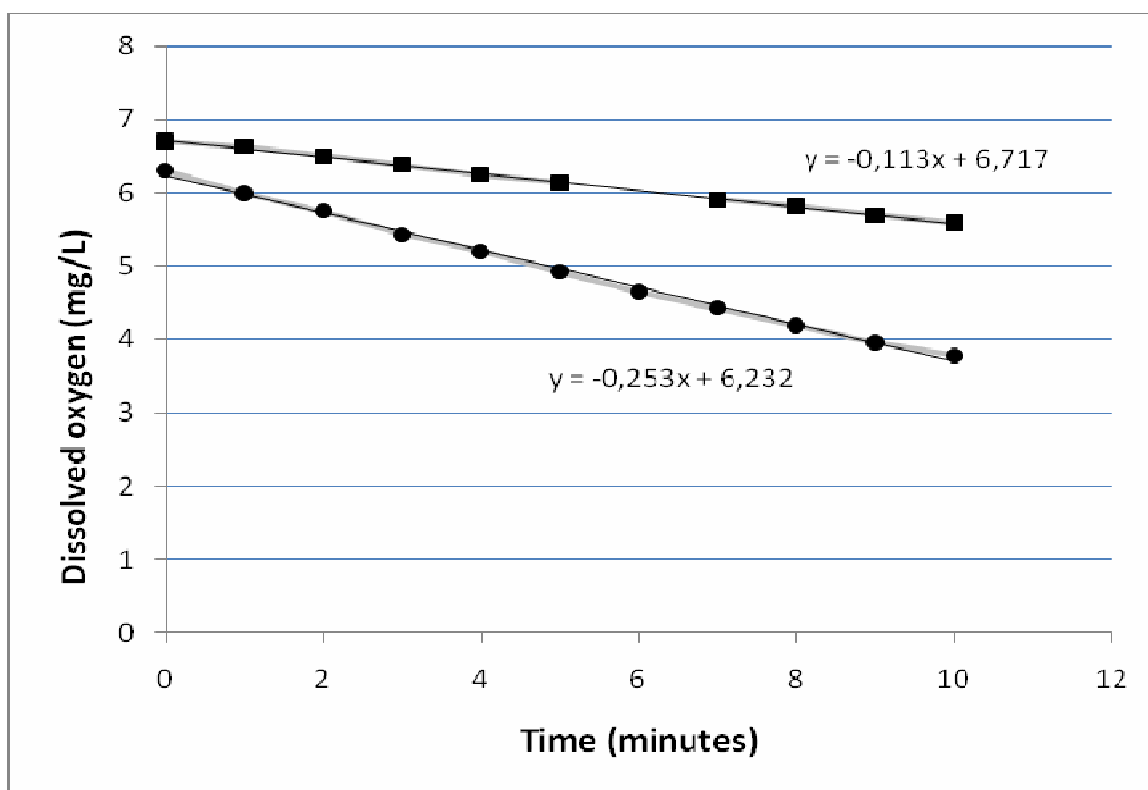


Figure 4. OURs (slopes) obtained with wastewater before and after fractionation.
(■ Original Wastewater; ● Fractionated Wastewater)

3.2. Anaerobic toxicity assay

Gas production was measured after time intervals of incubation of an anaerobic biomass in contact with the original composition wastewater as well as with the fractionated wastewater (Figure 5). The absence of gas production would mean total inhibition. The expected was that the same phenomenon observed with the aerobic biomass results would occur: that removing the toxic VOCs from wastewater would decrease toxicity and thus increase gas production of the biomass in contact to the fractionated sample. However, this was not observed. Actually, the fractionated wastewater digestion seemed to produce less gas (however, not statistically). This means that the VOCs had no observable toxic effect on the anaerobic biomass in the conditions tested.

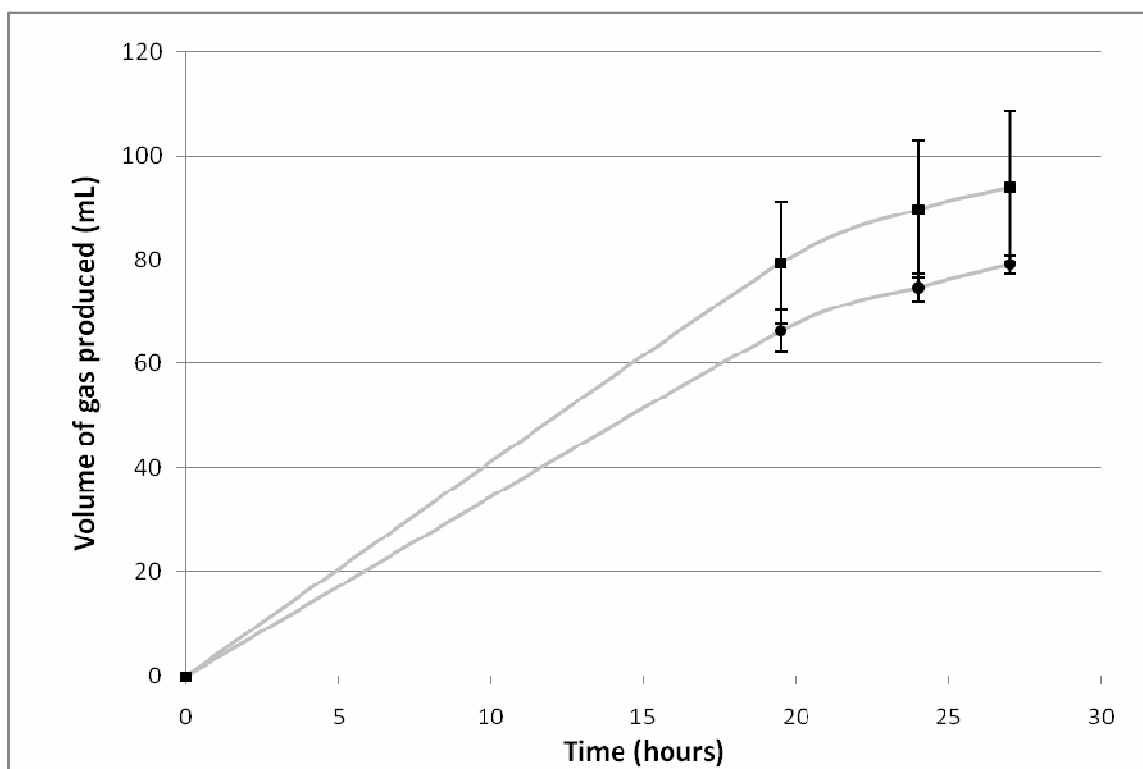


Figure 5. Anaerobic gas production bioassay results. (■ Original Wastewater; ● Fractionated Wastewater). Mean values of duplicates. Error bars show standard deviations.

4. DISCUSSION

Some toxic VOCs in this polyester manufacturing wastewater could not be identified by GC/MS analysis. However, a series of α,β -unsaturated aldehydes were identified among them.⁶ Aldehydes are of special interest in aquatic toxicology, because at lower concentration, they are more toxic than their nonreactive counterparts of equal hydrophobicity. Toxicity is enhanced in aldehydes by the presence of double bonds between carbons. Acrolein and Crotonaldehyde are examples of this kind of chemicals of extreme toxicity.⁹

Acrolein is listed in the United States as a toxic priority pollutant. However, it was demonstrated that it can be biodegraded by acclimated activated sludge and by anaerobic processes.^{10,11} The biodegradability of other related α,β -unsaturated aldehydes is less studied than acrolein.

It is known that biomass metabolism and toxicity resistance in aerobic and anaerobic environments are rather different.² These differences were shown in this study, in which similar concentrations of toxic substances could inhibit an aerobic biomass but had apparently no inhibition effect on an anaerobic biomass. In part, the difference can be explained by the amount of biomass in aerobic (≈ 0.75 g SSV/L) and anaerobic (≈ 1.5 g SSV/L) biotesting. Even so, a totally different toxicity response was still not expected.

Since the limiting step of anaerobic digestion is methanogenesis, a crucial factor would be to assure methane production by the biomass in contact with the wastewater. The volume measured in the anaerobic bioassay could be only due to gases generated in the hydrolisis step of anaerobic digestion, and not methane itself, which is the final step in digestion.¹¹

To that purpose, another assay was conducted. Dark glass flasks were filled and incubated with wastewater and the same anaerobic biomass in the same basic conditions described in 2.3. Different dillutions of wastewater were tested: 33, 40, 50 and 66% (v/v). After two weeks of incubation, the atmosphere of three of the flasks (33, 50 and 66%) was sampled with 60 mL syringes that had closing valves. A portion of the content of each syringe was injected in a gas cromatographer. Methane was detected in the the atmosphere of the three flasks.

Althought toxicants concentrations in the wastewater are unknown, this kind of testing was useful to preliminarily direct further studies to implement wastewater treatment in the industry. An anaerobic process should be considered for conducting treatability studies on this wastewater.

5. CONCLUSION

The acute toxicity response observed in the aerobic toxicity assay was not observed in the anaerobic bioassay, thus indicating that an anaerobic biomass could assimilate the toxicity of a series of toxic VOCs present in a polyester resin manufacturing wastewater better than an aerobic biomass. Methane production by the anaerobic biomass in contact with the wastewater was assured.

It was possible to retrieve relevant information on effluent properties that could direct further studies to implement wastewater treatment in the industry by the use of procedures, tests and analyses that are simple, inexpensive and not time consuming.

6. REFERENCES

- [1] Eckenfelder Jr., W. W.; *Industrial Water Pollution Control*, 3rd ed., McGraw Hill: Boston, 2000.
- [2] Grady L.C.P.; Daigger G.T.; Lim H.C.; *Biological Wastewater Treatment*, Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999.
- [3] Volskay, V. T.; Grady, P.L.; *J. Water Pollut. Control Fed.* **1988**, 60, 1850.
- [4] Owen, W. F.; Stuckey, D. C.; Healy, J. B. Jr.; Young, L. Y.; McCarty, P. L.; *Wat. Res.* **1979**, 13, 485.
- [5] Caffaro-Filho, R. A.; Morita, D. M.; Wagner, R.; Durrant, L. R.; *Journal of Hazardous Materials*. Submitted.
- [6] Caffaro-Filho, R. A. unpublished work.
- [7] OECD - Organization for Economic Co-operation and Development; Activated sludge, respiration inhibition test, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD Method 209, OECD: Paris, 1984.
- [8] Soto, M.; Méndez, R.; Lema, L. J.; *Wat. Res.* **1993**, 27, 1361.
- [9] Dimitrov, S.; Koleva, Y.; Schultz, T. W.; Walker, J. D.; Mekenyan, O.; *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, 23, 463.
- [10] Kincannon, D. F.; Stover, E. L.; Nichols, V.; Medley, D.; *J. Water Pollut. Control Fed.* **1983**, 55, 157.
- [11] Speece, R. E.; *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*, Archaea Press: Nashville, 1996.

CONCLUSÕES FINAIS

A abordagem orientada toxicidade provou ser uma ferramenta valiosa para alcançar os objetivos desta pesquisa, fornecendo resultados importantes na caracterização de uma água residuária pouco estudada até o momento, identificando o tipo de constituintes responsáveis por uma parcela significativa da toxicidade do efluente e identificando substâncias químicas responsáveis pelo efeito tóxico observado. Além disso, foi capaz de gerar subsídios para direcionar estudos de tratabilidade do efluente em questão.

Através desta abordagem, concluiu-se ser possível reduzir significativamente a toxicidade do efluente para uma biomassa de lodos ativados, adaptada ou não, caso sejam removidos compostos orgânicos voláteis (COVs) em pH elevado.

Foram obtidas evidências de volatilização de compostos tóxicos e mutagênicos em um tanque de aeração se este efluente for enviado para tratamento em uma estação de lodos ativados. Recomenda-se um tratamento do efluente para retirada de COVs antes da entrada do mesmo em algum tipo de sistema de tratamento aerado, ou alternativamente, a captação e tratamento dos gases emitidos no tanque de aeração.

Vale ressaltar que estas relevantes informações foram obtidas com o uso de procedimentos, testes e análises simples, rápidas e de baixo custo. Isso é particularmente importante no Brasil, onde os recursos financeiros e humanos na área de saneamento são escassos.

A análise orientada por toxicidade também permitiu a identificação de uma série de aldeídos insaturados (congêneres de acroleína) como responsáveis por parte do efeito tóxico observado quando do contato do efluente com uma biomassa de lodos ativados.

Durante a fase de confirmação da identificação destes compostos tóxicos, efetuou-se um ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*. Verificou-se com estes resultados que o efluente possui alta potência mutagênica quando comparado a outros efluentes industriais.

Este ensaio revelou que somente uma pequena fração da mutagenicidade do efluente foi removida com o fracionamento mais efetivo para remoção de toxicidade aguda (arraste com ar em pH 11). Isso quer dizer que a maior parte da causa da alta potência mutagênica observada neste efluente permanece desconhecida, e pode ser objeto de futuras investigações orientadas por efeitos. Neste caso, deve-se utilizar o próprio teste de mutagenicidade com *Salmonella* como o bioensaio direcionador.

Quando os compostos volatilizados em pH 11 presentes no efluente foram testados quanto a sua toxicidade para com uma biomassa anaeróbia, a mesma conseguiu assimilar muito melhor os efeitos tóxicos do que a biomassa de lodos

ativados. Durante os ensaios anaeróbios, foi detectado metano no *headspace* dos frascos onde a biomassa anaeróbia ficou em contato com o efluente.

Algumas características do efluente, como a alta carga orgânica e a baixa quantidade de sólidos em suspensão, juntamente com essa maior resistência à toxicidade dos compostos volatilizados em pH 11, indicam que processos anaeróbios podem ser adequados para o tratamento deste efluente. Vale ressaltar também que a volatilização de compostos tóxicos durante tratamento anaeróbio seria menor do que em um tratamento aeróbio por lodos ativados. É recomendável a condução de um estudo de tratabilidade envolvendo um processo anaeróbio, conjugado ou não com um sistema aeróbio, para verificação destas hipóteses.

É evidente que algumas das fontes de toxicidade presentes neste efluente de indústria produtora de resinas de poliéster permanecem não elucidadas, mas também fica claro que muito foi revelado através dos esforços realizados neste trabalho.

Portanto, pode-se afirmar que o resultado geral da aplicação da abordagem orientada por toxicidade, neste caso, não foi "desapontamento". Ao contrário, foram obtidas informações importantes sobre a fonte e a natureza dos efeitos observados, de modo que o esforços para o controle de poluição da água nesta indústria podem ser baseados em um conhecimento bem mais aprofundado do efluente em questão.